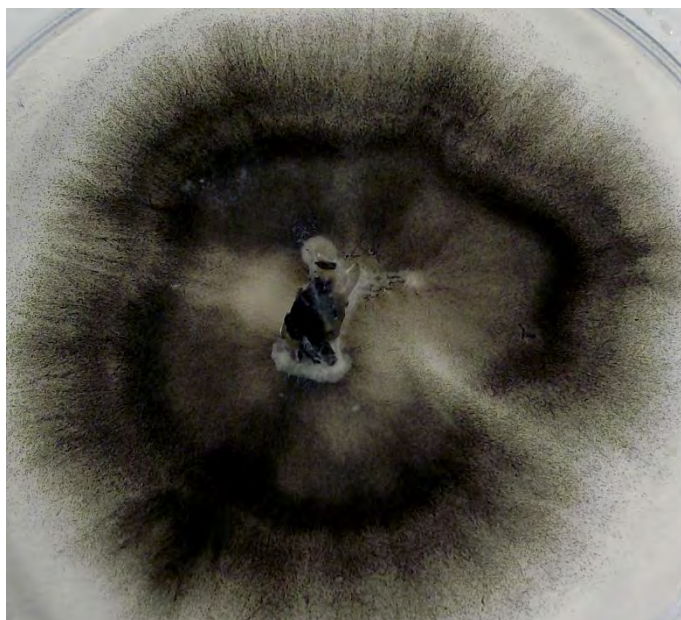


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
«Σχολή Γεωπονικών Επιστημών»
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού
Περιβάλλοντος
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Αειφόρος Αγροτική Παραγωγή και Διαχείριση Περιβάλλοντος»

«ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ»
«ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ»

«Επίδραση ιλύος βιολογικού καθαρισμού από λύματα βιομηχανίας τροφίμων
στη βιωσιμότητα μικροσκληρωτίων του μύκητα *Vettricillium dahliae* .»



Μαραγκού Ανδρομάχη

Βόλος 2015

«Επίδραση ιλύος βιολογικού καθαρισμού από λύματα βιομηχανίας τροφίμων στη βιωσιμότητα μικροσκληρωτίων του μύκητα *Vetricillium dahliae* .»

Μαραγκού Ανδρομάχη

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ε. ΒΕΛΛΙΟΣ	ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ	Επιβλέπων
Α. ΚΑΡΚΑΝΗΣ	ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΖΙΖΑΝΙΟΛΟΓΙΑΣ	ΠΘ
Β. ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ	ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΔΑΦΟΛΟΓΙΑΣ	ΠΘ

Copyright ' ΜΑΡΑΓΚΟΥ ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ, 2015.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος . All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας διατριβής, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης .

Η έγκριση της Μεταπτυχιακής Διατριβής Ειδίκευσης από το Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δε δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

Πρόλογος

Αρχίζοντας να δουλεύω με την διατριβή μου τον Απρίλιο του 2014 και τελειώνοντας με αυτή, το Μάιο του 2015, δηλαδή μέσα σε ένα χρόνο, διαπίστωσα πως πέρασε μια περίοδος που ήταν ιδιαίτερα απαιτητική σε χρόνο, αλλά παράλληλα ήταν εποικοδομητική και ιδιαίτερα σημαντική για μένα. Ο λόγος ήταν ότι συνέβαλε στο να διευρυνθούν οι πνευματικοί μου ορίζοντες και να εμπλουτιστούν οι γνώσεις μου μέσα από τις νέες επιστημονικές προσεγγίσεις .

Παρόλο που η πτυχιακή μου εργασία έγινε στο εργαστήριο εντομολογίας του Γεωργικού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέποντα καθηγητή τον αξιότιμο κύριο Λυκουρέση το έτος 1993, θεωρώ πως μετά από μια εικοσαετία απομάκρυνσης μου από τους εργαστηριακούς χώρους ,προσπάθησα και έδωσα τον καλύτερο εαυτό μου, προκειμένου να ανταπεξέρθω με όσο καλύτερο τρόπο μπορούσα, στις απαιτήσεις του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που με βοήθησαν τόσο στο ξεκίνημα όσο και στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής.

Θερμότατα ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Βέλλιο Ευάγγελο Επίκουρο Καθηγητή Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, για την ανάθεση του θέματος, για την φιλική διάθεση του, την καθοδήγησή του, τις πολύτιμες συμβουλές και κατευθύνσεις του σε όλα τα στάδια της διατριβής μου.

Ευχαριστώ θερμά τον κύριο Σακελλαρίου Δημήτριο, Δήμαρχο Καλαμπάκας κατά το έτος 2013, όπου παρόλο τις αυξημένες υποχρεώσεις που είχα και έχω στο Δήμο καταλαμβάνοντας θέση ευθύνης , με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την συναίνεσή του να συμμετάσχω στο ΠΜΣ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και μια μεγάλη ευκαιρία να πραγματοποιήσω την επιθυμία μου.

Ευχαριστώ επίσης όλους τους μηχανικούς της γαλακτοβιομηχανίας ΤΡΙΚΚΗ στα Τρίκαλα για την πολύτιμη συνεργασία που είχα μαζί τους και ιδιαίτερα τον κ. Κυριτσά Δημήτρη για την διάθεση του χρόνου του στη λήψη της ιλύος από το βιολογικό καθαρισμό.

Ευχαριστώ ακόμα όλους εκείνους τους φίλους και συνεργάτες που με στήριξαν και μου προσέφεραν τη βοήθεια τους, ιδιαίτερα την κ. Παναγιωτάκη Ευαγγελία φίλη και συνάδερφο για τον πολύτιμο χρόνο που μου διέθεσε αλλά και για την εξαιρετικά πολύτιμη εθελοντική

της εργασίας που είχα, όταν εγώ δεν μπορούσα να παρευρίσκομαι στο εργαστήριο λόγω και της μεγάλης απόστασης από τον τόπο διαμονής μου.

Οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την οικογένεια μου, τον σύζυγο και την κόρη μου για την συμπαράσταση που είχα αλλά και για την ενθάρρυνση τους σε αυτό που ήθελα να κάνω. Τους ευχαριστώ για τον χρόνο και χώρο που μου διέθεσαν προκειμένου να μπορέσω να ολοκληρώσω αυτό που ξεκίνησα εγκαίρως και σωστά.

Τέλος δεν θα ήθελα να ξεχάσω και όλους τους γνωστούς , φίλους και συναδέρφους μου οι οποίοι με στήριξαν με τον δικό τους τρόπο ο καθένας , δίνοντας μου δύναμη να συνεχίσω και να τελειώσω αυτό που ξεκίνησα.

Περίληψη

Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί, κατά πόσο μπορεί η ιλύς βιολογικού καθαρισμού από λύματα γαλακτοβιομηχανίας να επιδράσει στη βιωσιμότητα των μικροσκληρωτίων του μύκητα *Vetricillium dahliae*.

Η ιλύς βιολογικού καθαρισμού από λύματα γαλακτοβιομηχανίας διαχειρίστηκε ως πρώτη ύλη, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή και ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών ωφέλιμων για τη γεωργία όπως ο μύκητας *Trichoderma* sp. αλλά ταυτόχρονα επιβλαβών σε εδαφογενή παθογόνα όπως είναι ο μύκητας *Vetricillium dahliae*.

Εκτός από την ιλύ που διαχειρίστηκε ως πρώτη ύλη στο πείραμα, συνδυαστικά χρησιμοποιήθηκαν και τα εξής υλικά: ουρία (46-0-0), σακχαρόζη ($C_{12}H_{22}O_{11}$), σκόνη από σκεύασμα ωφέλιμων μικροοργανισμών (MYCOSAT-F) και τέλος καλαμιά σιταριού.

Από την διαχείριση της ιλύος με την ουρία, δεν πάρθηκαν θετικά αποτελέσματα ως προς την ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. και το ίδιο συνέβη με την χρήση του σκευάσματος των ωφέλιμων μικροοργανισμών (MYCOSAT-F) αλλά και με την ίδια την ιλύ από μόνη της χωρίς την προσθήκη κανενός υλικού.

Καθοριστική όμως είναι η συμμετοχή της σακχαρόζης αλλά και της καλαμιάς σιταριού καθώς από τα αποτελέσματα που πήραμε φάνηκε πως η προσθήκη γλυκαντικής ουσίας λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma* sp.. Η μεταχείριση της καλαμιάς μαζί με την ιλύ αλλά ταυτόχρονα με προσθήκη σακχαρόζης έδωσε εκπληκτικά αποτελέσματα.

Διαφαίνεται λοιπόν πως με δύο υλικά τα οποία θεωρούνται ευτελή και άχρηστα, τόσο όσο αφορά την ιλύ η οποία αποτελεί απόβλητο για τη βιομηχανία, όσο και η καλαμιά η οποία καίγεται κάθε χρόνο από τους αγρότες μας καθώς αυτοί προσπαθούν να απαλλαγούν από αυτή, μπορούμε να τα χρησιμοποιήσουμε ως υποστρώματα ανάπτυξης ωφέλιμων βιοπαραγόντων, και αυτά να προωθηθούν στην συνέχεια ως εδαφοβελτιωτικά με ταυτόχρονη καταπολέμηση εδαφογενών παθογόνων.

Η επέμβαση με τον ανταγωνιστή μύκητα *Trichoderma* sp. ο οποίος είχε αναπτυχθεί με τη βοήθεια της ιλύος, σε φυτάρια βασιλικού και μελιτζάνας, στις ρίζες των οποίων υπήρχαν μικροσκληρώτια του παθογόνου *Vetricillium dahliae* δεν ευδοκίμησε λόγω απρόβλεπτων παραγόντων που μπορεί να υπάρξουν πάντα σε ένα πείραμα.

Λέξεις κλειδιά: *Trichoderma*, σακχαρόζη, ουρία, καλαμιά.

Summary

Effect of sewage sludge from wastewater food industry to the viability of the microsclerotia of fungus *Vetricillium dahliae*.

In this study an attempt was made to investigate, whether are sewage sludge and wastewater from dairy process plants were able to affect the viability of the microsclerotia of fungus *Vetricillium dahliae*.

The sewage sludge and the waste water from dairy waste handled as raw material, were used for culture of competitive beneficial microorganisms in agriculture as the fungus *Trichoderma* sp. but also to control harmful diseases caused by soil-borne pathogens such as fungus *Vetricillium dahliae*.

Besides the sewage sludge and wastewater from dairy plants, that was used as raw material in the experiment, they were also used the following materials: urea (46-0-0), saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), beneficial microorganisms (MYCOSAT-F) and finally wheat stubble.

When wastewater and urea, were used in order to culture the fungus *Trichoderma* sp. the results were not positive as well as when the beneficial microorganisms (MYCOSAT-F) were used with or without sludge.

Essential however, was the addition of sucrose or wheat stubble, and the results obtained showed that the addition of sweetening agent functions as an energy source for the growth of the mycelium of the fungus *Trichoderma* sp.. The combination of stubble with wastewater but also with the addition of sucrose gave amazing results.

It appears therefore, that two materials that are considered trivial and useless, the wastewater which is waste for the industry, and the stubble that is waste from agriculture farmers, burn it as they try to get rid of it, they can both be used as growth substrates useful microorganisms that can be used as biocontrol agents whilst to control soil-borne fungi diseased.

The BCA (biocontrol agent) *Trichoderma* sp. was cultured in growth medium based on wastewater and add to soil of basil and eggplant seedling. The seedling died before and results could be obtained.

«Εγώ, η Μαραγκού Ανδρομάχη είμαι η συγγραφέας αυτής της Μ.Δ.Ε. Αυτή η Μ.Δ.Ε. αντικατοπτρίζει την έρευνα που έγινε από εμένα και δεν έχει υποβληθεί (εξ ολοκλήρου ή μέρος της) σαν προπτυχιακή διατριβή ή Μ.Δ.Ε. ή ως μέρος Διδακτορικής Διατριβής σε αυτό ή άλλο Προπτυχιακό ή Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης του εσωτερικού ή εξωτερικού. Όποια συνεργασία καθώς και το μέγεθος αυτής δηλώνονται επακριβώς στο αντίστοιχο πεδίο αυτής της διατριβής .Επίσης έχω διαβάσει όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που παρατίθενται στο τέλος.»

Υπογραφή συγγραφέα

« Ως επιβλέπων της έρευνας που περιγράφεται σε αυτή τη διατριβή , δηλώνω ότι όλοι οι όροι του Εσωτερικού Κανονισμού του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος έχουν τηρηθεί από την κα Μαραγκού Ανδρομάχη.»

Υπογραφή επιβλέποντος καθηγητή

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ο παθογόνος μύκητας <i>Vetricillium dahliae</i>	1
1.1.1 Κατάταξη του μύκητα	1
1.1.2 Βιολογία του μύκητα.....	1
1.1.3 Εύρος ξενιστών και συμπτώματα	2
1.1.4 Συνθήκες ανάπτυξης –ένταση ασθένειας.....	4
1.1.5 Μέθοδοι αντιμετώπισης της ασθένειας βερτισιλλίωσης.....	4
1.2 Μύκητες του γένους <i>Trichoderma</i> sp.	6
1.2.1 Συστηματική κατάταξη.....	6
1.2.2 Βιολογία	6
1.2.3 Συνθήκες ανάπτυξης	7
1.2.4 Χρήση μυκήτων του γένους <i>Trichoderma</i> sp. ως βιολογικοί παράγοντες	8
1.2.5 Μηχανισμοί δράσης του μύκητα <i>Trichoderma</i> sp.	8
1.3 Απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων	12
1.3.1 Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα	13
1.3.2 Μέθοδοι κατεργασίας του νωπού γάλακτος.....	14
1.3.3 Τυρόγαλο.....	15
1.3.4 Απόβλητα τυροκομικών μονάδων και περιβαλλοντικές επιπτώσεις.....	16
1.3.5 Απόβλητα γαλακτοκομικών μονάδων και περιβαλλοντικές επιπτώσεις	17
1.4 Σκοπός της εργασίας	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1 Απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας	20
2.1.1 Διαχωρισμός - επεξεργασία φάσεων.....	22
2.2 Μικροοργανισμοί.....	24
2.3 Διαχείριση του μύκητα <i>Trichoderma</i> sp. με την ιλύ αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας.....	24
2.3.1 Ανάπτυξη <i>Trichoderma</i> sp. σε ιλύ αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας.....	24
2.3.2 Ανάπτυξη <i>Trichoderma</i> sp. σε ιλύ αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας με προσθήκη ουρίας	27

2.3.3 Ανάπτυξη <i>Trichoderma</i> sp. σε ιλύ αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας με προσθήκη σακχαρόζης	29
2.4 Διαχείριση του μύκητα <i>Trichoderma</i> sp. με τα υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας	29
2.4.1 Ανάπτυξη <i>Trichoderma</i> sp. σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας	29
2.4.2 Ανάπτυξη <i>Trichoderma</i> sp. σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας με προσθήκη ουρίας	30
2.4.3 Ανάπτυξη <i>Trichoderma</i> sp. σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας με προσθήκη σακχαρόζης	31
2.4.4 Ανάπτυξη ωφέλιμων μικροοργανισμών σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας	34
2.4.5 Ανάπτυξη <i>Trichoderma</i> sp. σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας με σακχαρόζη και καλαμιά	35
2.5 Εφαρμογή των <i>Verticillium dahliae</i> και <i>Trichoderma</i> sp. σε βασιλικό και μελιτζάνα	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
3.1. Ιλύ - <i>Trichoderma</i> sp. , υγρά απόβλητα- <i>Trichoderma</i> sp.	44
3.2. Ιλύ– ουρία- <i>Trichoderma</i> sp., υγρά απόβλητα - ουρία - <i>Trichoderma</i> sp.	46
3.3. Ιλύ–σακχαρόζη- <i>Trichoderma</i> sp., υγρά απόβλητα - ουρία - <i>Trichoderma</i> sp.	47
3.4. Sdi νερό – σακχαρόζη - <i>Trichoderma</i> sp.	57
3.5. Υγρά απόβλητα - ωφέλιμοι μικροοργανισμοί	63
3.6. Υγρά απόβλητα (Υ) –καλαμιά (Κ) – σακχαρόζη (Σ) - <i>Trichoderma</i> sp. (Τ)	63
3.7. <i>Verticillium dahliae</i> και <i>Trichoderma</i> sp. σε βασιλικό και μελιτζάνα	67
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	68
4.1 Συζήτηση-Συμπεράσματα	68
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72
5.1 Διεθνής Βιβλιογραφία	72
5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία	78
5.3 Ηλεκτρονικές πηγές	78

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο παθογόνος μύκητας *Vetricillium dahliae*

1.1.1 Κατάταξη του μύκητα

Οι μύκητες του γένους *Verticillium* ανήκουν στην κλάση *Adelomycetes* , στην τάξη *Moniliales* και στην οικογένεια *Moniliaceae*. Τα είδη που αναφέρονται είναι τα *V. albo-atrum* Reinke and Berthold, *V. dahliae* Kleb., *V. nigrescens* Pethy., *V. nubilum* Pethy. και *V. tricorpus* Isaac. Από τους ανωτέρω προαναφερόμενους , αυτοί που είναι οι πλέον επιζήμιοι στα φυτά προκαλώντας τις μεγαλύτερες απώλειες είναι οι *V. albo-atrum* και *V. dahliae* .

1.1.2 Βιολογία του μύκητα

Το μυκήλιο του μύκητα *Vetricillium dahliae* είναι πολυκύτταρο, αρχικά υαλώδες και στη συνέχεια γίνεται καστανό. Σχηματίζει ελεύθερους , ανορθωμένους , πολυκύτταρους κονιδιοφόρους. Στους κονιδιοφόρους σχηματίζονται 3-4 πλάγια ,κοντά, μονοκύτταρα φιαλίδια, στις κορυφές των οποίων σχηματίζονται τα κονίδια (φιαλιδοσπόρια). Τα κονίδια είναι μονοκύτταρα ωοειδή, διαστάσεων 2,5-8 μm X 1,4-3,2 μm. Στην κορυφή κάθε φιαλιδίου παράγονται πολλά κονίδια τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μία κολλώδη ουσία σχηματίζοντας μικρές κεφαλές κονιδίων. Η ελευθέρωση των κονιδίων γίνεται με νερό (Παναγόπουλος, 1987).

Ο βιολογικός κύκλος του μύκητα έχει ως εξής (Tolmsoff, 1973):

1. Διέγερση των μικροσκληρωτίων από τις εκκρίσεις του ριζικού συστήματος και βλάστηση αυτών
2. Παραγωγή κονιδίων
3. Είσοδος των υφών στο αγγειακό σύστημα του φυτού ξενιστή
4. Δημιουργία κονιδίων και γρήγορη διασπορά αυτών σε όλο το φυτό.
5. Νέκρωση του ξενιστή
6. Δευτερογενής προσβολή των νεκρών ιστών του ξενιστή από μυκήλια.
7. Μετάπτωση από μονοκάρυα σε δικάρυα κατάσταση και δημιουργία μικροσκληρωτίων μέσα στους νεκρούς ιστούς .
8. Παραγωγή απλοειδών παραλλαγών μικροσκληρωτίων
9. Απελευθέρωση μικροσκληρωτίων από τα αποσυντιθέμενα φυτικά υπολείμματα.

Το εδαφοπαθογόνο *V. dahliae* διατηρείται στο έδαφος και μπορεί να επιβιώσει για πάρα πολλά χρόνια (από 8-14 χρόνια) ακόμα και χωρίς την παρουσία ξενιστών, κυρίως με την ανθεκτική μορφή των μικροσκληρωτίων (Garber, 1973) . Μπορεί να επιβιώσει επίσης και σαν μυκήλιο και κονίδια στα προσβεβλημένα υπολείμματα της καλλιέργειας.

Ένας άλλος τρόπος επιβίωσης του παθογόνου και αύξησης των μολυσμάτων του στο έδαφος είναι τα ζιζάνια ξενιστές του. Κάποια από αυτά εμφανίζουν συμπτώματα όταν μολυνθούν, ενώ άλλα δεν εμφανίζουν συμπτώματα παρόλο που έχουν στα αγγεία τους τον μύκητα και έτσι με την ενσωμάτωσή τους στο έδαφος συμβάλλουν στον εμπλουτισμό του εδάφους με το μόλυσμα (μικροσκληρώτια). Η τοπική διασπορά των μολυσμάτων γίνεται με το νερό, τα υπολείμματα της καλλιέργειας , τα ζιζάνια και με το έδαφος που μεταφέρεται με τα εργαλεία και μηχανήματα κατεργασίας του εδάφους . Σε μεγάλες αποστάσεις το παθογόνο μεταφέρεται κυρίως με το μολυσμένο πολλαπλασιαστικό υλικό .

Οι μολύνσεις των φυτών γίνονται κυρίως από τις ρίζες με απ'ευθείας είσοδο του παθογόνου. Η είσοδος του παθογόνου διευκολύνεται από πληγές που προκαλούνται στις ρίζες από νηματώδεις ή έντομα. Μετά την είσοδο του ο μύκητας προχωρεί και εγκαθίσταται στα αγγεία του ξύλου. Μέσα στις αγγειώδεις δεσμίδες παρατηρείται το μυκήλιο και τα κονίδια του μύκητα. Τα κονίδια μεταφέρονται με το ανοδικό ρεύμα κυκλοφορίας των χυμών και έτσι μολύνουν όλο το φυτό. Έχουν διαπιστωθεί αξιόλογες διαφορές μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών ως προς την ευπάθεια τους στην ασθένεια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν προς όφελος της γεωργίας , αλλά και τότε ακόμα το παθογόνο αντιδρά στην δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών με την εμφάνιση νέων φυλών οι οποίες έχουν μεγαλύτερη παθογόνο ικανότητα για τις ευπαθείς ποικιλίες (Bell, 1973).

1.1.3 Εύρος ξενιστών και συμπτώματα

Τα εδαφογενή παθογόνα του γένους *Verticillium dahliae* έχουν μεγάλο αριθμό ξενιστών (πάνω από 250 φυτικά είδη), στα οποία περιλαμβάνονται ψυχανθή, ανθοκομικά, ακρόδρυα, δενδρώδη, δασικά , ζιζάνια, βαμβάκι, ντομάτα, μελιτζάνα πιπεριά κ.α. (Thanassoulouopoulos and Kitsos 1972; Eastburn and Chang 1994; Pesti *et al.*,1985). Πρόκειται για ένα παθογόνο που προκαλεί πάρα πολύ σημαντικές απώλειες σε μεγάλο εύρος ξενιστών και σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των φυτών. Το *V. Dahliae* έχει μεγαλύτερη παθογόνο δράση και μεγαλύτερο αριθμό ξενιστών από το *V. albo-atrum* (Smith, 1965; Schnathorst, 1973).

Κύρια συμπτώματα της ασθένειας είναι μαρασμός κλάδων με ταυτόχρονη χλώρωση φύλλων, στη συνέχεια ακολουθεί καρούλιασμα , φυλλόπτωση και τελικά ξήρανση των προσβεβλημένων κλάδων (Εικόνες 1.1.3.1 - 1.1.3.2). Χαρακτηριστικό αποτελεί η μονόπλευρη εμφάνιση των συμπτωμάτων, ενώ στην αντίθετη πλευρά δεν εμφανίζονται

συμπτώματα (ημιπληγία). Έρευνες στην πατάτα έδειξαν ότι από το μύκητα παράγεται ένα υψηλού μοριακού βάρους σύμπλεγμα πρωτεΐνη λιποπολυσαχαρίτης (PLP) το οποίο είναι φυτοτοξικό και σχετίζεται με την παθογένεια (Nachmias, *et al.*, 1982). Αντίθετα στα βαμβάκοφυτα έρευνες έχουν δείξει ότι τα συμπτώματα προκαλούνται από τοξίνες χαμηλού μοριακού βάρους (Keen *et al.*, 1972).



Εικόνα 1.1.3.1. Μεταχρωματισμός των αγγείων του ξύλου σε κλάδο ελιάς



Εικόνα 1.1.3.2. Μάρανση ξήρανση κλάδων από το μύκητα

1.1.4 Συνθήκες ανάπτυξης ένταση ασθένειας

Το *Verticillium albo-atrum* προσδιορίστηκε από τους Reinke and Berthold (1879) στη Γερμανία σε φυτά πατάτας . Ο μύκητας αναπτύσσεται σε μέσες θερμοκρασίες από 20-24 °C με ΡΗ εδάφους = 8.0 - 8.6 και είναι περισσότερο διαδεδομένος σε ψυχρότερες περιοχές με υγρό κλίμα όπως είναι εκείνες που βρίσκονται στη Βόρεια Ευρώπη. Σχηματίζει κονίδια διαστάσεων 3.5-8.0 X 2-3 μ και μαύρο μυκήλιο χωρίς μικροσκληρώτια. Ο *Verticillium dahliae* προσδιορίστηκε σε φύλλα ντάλιας (Klebhan, 1916). Ευνοείται από μέσες θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 21-27 °C (25-28°C για ορισμένες φυλές) και ΡΗ εδάφους 5.3-7.2 . Επικρατεί σε θερμότερες περιοχές και αποτελεί σοβαρότατο παθογόνο σε Μεσόγειο και Νότιο Ευρώπη.

Η ένταση της ασθένειας εξαρτάται από πολλές παραμέτρους μεταξύ των οποίων είναι η θερμοκρασία, η πυκνότητα του μολύσματος, η φυλή του παθογόνου, το έδαφος , τα ζιζάνια, οι βροχοπτώσεις , η ποικιλία του φυτού και οι καλλιεργητικές επιδράσεις . Από τις σημαντικότερες παραμέτρους αποτελούν οι περιβαλλοντικές συνθήκες οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση της ασθένειας (Brinkerhoff, 1973). Για παράδειγμα όταν η θερμοκρασία ανέβει πάνω από 30°C, όλες οι ποικιλίες βαμβακιού αποκτούν ανθεκτικότητα (Bell & Presley 1969 ; Garber & Presley 1971; Pullman & Devay, 1982).

Επίσης και για την μελιτζάνα υπάρχουν ποικιλίες με διαφορετικό βαθμό ευπάθειας ο οποίος εξαρτάται από το γενότυπο του φυτού, τις συνθήκες περιβάλλοντος και τη φυλή του παθογόνου (Bell, 1973).

1.1.5 Μέθοδοι αντιμετώπισης της ασθένειας βερτισιλλίωσης

Η αντιμετώπιση της ασθένειας στη πράξη δεν είναι εφικτή με τη χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων, αλλά στηρίζεται σε μια σειρά καλλιεργητικών μέτρων πρόληψης. Μείζονος σημασίας είναι η χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού , χρησιμοποίηση ανθεκτικών ή ανεκτικών ποικιλιών , αποφυγή δημιουργίας πληγών των ριζών, αποφυγή άρδευσης με αυλάκια (διότι το μόλυσμα μεταφέρεται με το νερό άρδευσης), καταπολέμηση ζιζανίων κ.ά. Σε περιπτώσεις εκδήλωσης συμπτωμάτων, συνίσταται, αφαίρεση των προσβεβλημένων φυτών και καταστροφή με φωτιά (Παναγόπουλος, 1987).

Έχουν χρησιμοποιηθεί ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί με σκοπό να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων μυκήτων (Huber *et al.*, 1987) . Η αντιμετώπιση της ασθένειας με τη χρήση ανταγωνιστικών μικροοργανισμών βασίζεται στην ικανότητα τους να αποικίζουν τις ρίζες, παράγοντας ουσίες οι οποίες δρουν ενάντια στα παθογόνα (Thomashow *et al.*, 1990) . Η βιολογική αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλείται από το φυτοπαθογόνο μύκητα *V. dahliae* και γενικότερα των ασθενειών που προκαλούνται από εδαφογενή παθογόνα εξαρτάται από το

περιβάλλον της ριζόσφαιρας (όπου λαμβάνει χώρα η αλληλεπίδραση της ρίζας και του εδάφους). Η ριζόσφαιρα είναι η περιοχή που περιβάλλει τη ρίζα και τα ακρορίζια και είναι ο αποδέκτης των εκκρίσεων της και χαρακτηρίζεται από μικροβιακή μικροχλωρίδα προσαρμοσμένη σε αυτό το περιβάλλον.

Αρκετοί ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί στο μύκητα *Verticillium dahliae* έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί, όπως, *Gliocladium roseum* Bainier, *Phanerochaete chrysosporium* Dercks, *P. vermiculatum* Dangeard, και την τέλεια μορφή *Talaromyces flavus* (Klöckner) Stolk & Samson, *Trichoderma harzianum* Rifai και *Trichoderma viride* Pers. ex FR. (Dutta, 1981; Ghaffer *et al*, 1988; Henni, 1988; Keinath *et al*, 1991).

Βιολογική καταπολέμηση αδρομύκωσης μελιτζάνας οφειλόμενη στο μύκητα *Verticillium dahliae* σε υπαίθρια καλλιέργεια εφαρμόστηκε πρώτη φορά το 1982 από τους Marios *et al.*, όπου αποδείχτηκε ότι η χρήση του βιολογικού παράγοντα *Talaromyces flavus* μείωσε το μόλυσμα.

Εκτός από μύκητες, συγκεκριμένα βακτήρια έχουν βρεθεί πως περιορίζουν την ανάπτυξη του μύκητα *dahliae*. Τα μικροσκληρώτια του παθογόνου σε εδάφη με ή ψηλό ή χαμηλό pH εδάφους αποικίζονται γρήγορα από βακτήρια. Αποικισμός στους μύκητες παρατηρείται και στους δυο τύπους εδαφών. Τα βακτήρια επικρατούν σε εδάφη με υψηλό pH ενώ αντίθετα οι μύκητες ευνοούνται σε χαμηλό pH. Διάφορα βακτήρια φαίνεται να μπορούν να αποικίσουν μικροσκληρώτια. Μερικά φαίνονται να εφάπτονται στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροσκληρωτίων και να προκαλούν την διόγκωση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ άλλα φαίνονται να εισέρχονται στα υπολείμματα του κυτταρικού τοιχώματος το οποίο έχει χάσει την συνοχή του και έχει υποστεί λύση. Τα βακτήρια διεισδύουν στα κύτταρα των μικροσκληρωτίων μέσα από τους κυτταρικούς πόρους (Baard *et al.*, 1981). Οι Wadi and Easton, (1985) χρησιμοποίησαν βακτήρια για να αντιμετωπίσουν ασθένεια προερχόμενη από το μύκητα *dahliae*. Στελέχη των *Pseudomonas*, *Cellulomonas* και *Streptomyces* αποίκισαν τις ρίζες πατατών και αύξησαν την παραγωγή σε θερμοκήπια.

Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* είναι ανταγωνιστής του *Verticillium dahliae* *in vitro*. Στο χωράφι όμως το *Pseudomonas fluorescens* δεν είχε επίδραση στο παθογόνο μύκητα (Leben *et al.*, 1987). *In vitro* το *Enterobacter cloacae* αναχαίτισε την ανάπτυξη του *Verticillium dahliae* (Fravel, 1988).

Αντιβιοτικά που παρήχθησαν από το βακτήριο *Bacillus subtilis* απομονώθηκαν από το *Ulmus americana* L και επέδρασαν αρνητικά στην ανάπτυξη του *Verticillium dahliae* σε βιοδοκιμές *in vitro*. (Schreiber *et al.*, 1988).

Οι Berg and Ballin, (1994) ταυτοποίησαν τους μικροοργανισμούς *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas paucimobilis* και *Stenotrophomonas maltophilia* σαν ανταγωνιστές σε *in vitro* πειράματα. Πολλά ανταγωνιστικά ριζοβακτήρια έχουν αναφερθεί σε

πολλά πειραματικά που έχουν γίνει δίνοντας πεδίο για περισσότερη διερεύνηση των δυνατοτήτων που προσφέρουν.

Επιπλέον πάρα πολύ καλά αποτελέσματα έχει δώσει σε αγρούς οι οποίοι έχουν το μόλυσμα η ηλιοαπολύμανση του εδάφους (κάλυψη της επιφάνειας του εδάφους με διαφανή πλαστικά φύλλα από τον Ιούλιο μέχρι Σεπτέμβριο). Η ηλιοαπολύμανση είναι μια υγροχημική και βιολογική διεργασία προκαλώντας αύξηση της μέγιστης θερμοκρασίας κατά 10-15°C πάνω από τη θερμοκρασία του ακάλυπτου εδάφους με συνέπεια την θανάτωση των ευαίσθητων παθογόνων μυκήτων (όπως είναι ο *dahliae*) και επικράτηση των ενδημικών ειδών παραγόντων βιολογικής καταπολέμησης όπως είναι οι μύκητες *Trichoderma*, *Talaromyces*, *Aspergillus*. (πηγή : <http://www.sustainablefumigation.eu>).

Η ηλιοαπολύμανση του εδάφους είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών στις εύκρατες και υποτροπικές περιοχές.

1.2 Μύκητες του γένους *Trichoderma* sp.

1.2.1 Συστηματική κατάταξη

Οι μύκητες του γένους *Trichoderma* sp. ανήκουν στην κλάση Αδηλομύκητες , στην τάξη Moniliales και στην οικογένεια Moniliaceae. Το γένος *Trichoderma* περιλαμβάνει πάνω από 20 είδη με πιο συνήθη τα *T. aureoviride*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii* και *T. viride*.

1.2.2 Βιολογία

Οι μύκητες του γένους *Trichoderma* sp. σχηματίζουν πλούσιους ιδιαιτέρως πολύμορφους κονιδιοφόρους οι οποίοι είναι διακλαδισμένοι και φέρουν στο άκρο των διακλαδώσεων τους ομάδες κονιδίων. Τα κονίδια είναι υαλώδη ή υποπράσινα , σφαιρικά και διαμέτρου 3-4 μm (Εικόνα 1.2.2.1).



Εικόνα 1.2.2.1. Φωτογραφία από μικροσκόπιο των υφών και καρποφοριών του μύκητα *Trichoderma* sp.

1.2.3 Συνθήκες ανάπτυξης

Τα είδη μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Trichoderma* sp. βρίσκονται παντού στον κόσμο και μπορούν να απομονωθούν εύκολα από το έδαφος, αποσυντιθέμενα ξύλα και άλλα οργανικά φυτικά υπολείμματα (Kubicek *et al.*, 2008; Jaklitsch , 2009). Μπορούν να αναπτυχθούν σε διαφορετικά περιβάλλοντα αλλάζοντας το ρυθμό ανάπτυξής τους , τη δημιουργία κονιδίων , την παραγωγή ενζύμων προσαρμοζόμενοι έτσι στο περιβάλλον και στις υπάρχουσες συνθήκες . Μια βασική παράμετρος είναι και η ύπαρξη φωτός .Έρευνες έχουν γίνει για την ανάπτυξη και τη φυσιολογία του μύκητα παρουσία φωτός (Schmolletal, 2010).

Εκτός από το φως άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη των μυκήτων του γένους *Trichoderma* sp. είναι η θερμοκρασία, υγρασία, η ύπαρξη οργανικής ύλης, ο ανταγωνισμός. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τους μύκητες του γένους *Trichoderma* sp. είναι περί τους 25-30 °C. Όμως οι *T. Viride* και *T. Polysporum* μπορούν να αναπτυχθούν ακόμα και στους 2 °C, ενώ οι μύκητες *T. harzianum* και *T. Longibrachiatum* δεν αναπτύσσονται κάτω από τους 5 °C (Schmolletal, 2010).

1.2.4 Χρήση μυκήτων του γένους *Trichoderma* sp. ως βιολογικοί παράγοντες

Μύκητες που ανήκουν στο γένος *Trichoderma* sp. ήταν γνωστοί από το 1920 για την ικανότητά τους να δρουν ως βιολογικοί παράγοντες ενάντια σε φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Harman *et al.*, 2000).

Μερικοί από τους πιο σημαντικούς φυτοπαθογόνους μύκητες που έχουν αναφερθεί να παρασιτούνται από είδη *Trichoderma* sp. είναι οι εξής: *Fusarium oxysporum*, *Armillaria mellea*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Ustilago segetum* και *Verticillium* spp..

Οι μύκητες *Trichoderma* sp. είναι από τους σπουδαιότερους παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης εδαφογενών ασθeneιών. Έρευνες έχουν δείξει ότι ενδεχομένως, οι μύκητες αυτοί μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την προστασία της παραγωγής μετασυλλεκτικά απέναντι σε παθογόνους μύκητες αλλά ακόμα στην άμυνα του φυτού προκειμένου να παραμείνει υγιές σε επιθέσεις παθογόνων (Yedidia *et al.*, 1999).

Ήδη στην αγορά υπάρχουν σκευάσματα με βιολογικούς παράγοντες αντιμετώπισης φυτοπαθογόνων μυκήτων και τα οποία αναμένεται να συμβάλλουν στη φυτοπροστασία μέσα από μια IPM διαχείριση. Το Trichodex αποτελεί ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελώντας μια απομόνωση του μύκητα *Trichoderma harzianum*.

1.2.5 Μηχανισμοί δράσης του μύκητα *Trichoderma* sp.

➤ Μυκοπαρασιτισμός και παραγωγή αντιβιοτικού (τοξίνη)

Ο Weindling (1932) περιγράφει λεπτομερώς το μυκοπαρασιτισμό των υφών του *Rhizoctonia solani* από τις υφές του μύκητα *Trichoderma* sp., συμπεριλαμβανομένης της περιελίξεως γύρω από τις υφές του παθογόνου, της διείσδυσης, και της επακόλουθης διάλυσης του κυτταροπλάσματος του ξενιστή. Αυτό το φαινόμενο συνέβη ανεξάρτητα από την εξωτερική παροχή θρεπτικών συστατικών για τον ξενιστή ή το μυκοπαράσιτο.

Μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις ο μύκητας *T. lignorum* να ενεργεί ως ανταγωνιστής του *R. solani*, για τα θρεπτικά συστατικά, ο μυκοπαρασιτισμός όμως ήταν ο κύριος μηχανισμός για τη βιολογική καταπολέμηση. Ένα στέλεχος του *T. lignorum* παρήγαγε μια θανατηφόρο αρχή που εκκρίνεται στο περιβάλλον, επιτρέποντας παρασιτική δραστηριότητα από τον παράγοντα βιολογικού ελέγχου (Weindling, 1934).

Η ουσία αυτή ήταν τοξική για τα *R. Solani* και *Sclerotinia americana*, και ονομάστηκε γλυτοτοξίνη (Weindling, 1941). Αποδείχθηκε ότι ο μύκητας που παρήγαγε τη γλυτοτοξίνη δεν ήταν το *T. lignorum*, αλλά το *Gliocladium virens* (Webster and Lomas, 1964), ένα είδος που πρόσφατα μετονομάστηκε σε *Trichoderma virens* (Rehner and Samuels, 1994).

Πολλές περιπτώσεις επιτυχούς βιολογικού ελέγχου με είδη του γένους *Trichoderma* sp. έχουν αποδοθεί στους μηχανισμούς του μυκοπααρασιτισμού και την αντιβίωση (Howell *et al.*, 1993).

Ένα νέο αντιβιοτικό ανακαλύφθηκε το gliovirin, που παράγεται από το είδος *Gliocladium virens* συν. (*Trichoderma virens*) (GV-P) το οποίο ανέστειλε την ανάπτυξη του είδους *Pythium ultimum* και είχε δράση σε είδη του *Phytophthora*, αλλά όχι στα *R. solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Phymatotrichum omnivorum*, *Rhizopus arrhizus*, και *Verticillium dahliae*. Το gliovirin δεν είχε επίσης ανασταλτική δράση στα βακτήρια *Bacillus thuringensis* και *Pseudomonas fluorescens* (Howell and Stipanovic, 1983) .

➤ **Ανταγωνισμός και επάρκεια της Ριζόσφαιρας**

Άλλος ένας μηχανισμός ανταγωνισμού των βιολογικών παραγόντων του γένους *Trichoderma* sp. είναι η κατάληψη ζωτικού χώρου στη ρίζα φυτών ξενιστών. Η επάρκεια της ριζόσφαιρας είναι σημαντική, διότι ένας παράγοντας βιολογικής αντιμετώπισης δεν μπορεί να ανταγωνίζεται για τον χώρο και τα θρεπτικά συστατικά, αν δεν μπορεί να αναπτυχθεί στη ριζόσφαιρα.

Είδη του γένους *Trichoderma* sp., είτε προστίθενται στο έδαφος ή όταν εφαρμόζονται ως επικάλυψη των σπόρων αναπτύσσονται ακολουθώντας το ριζικό σύστημα του φυτού (Harman, 2000). Μετά από μία περίοδο επώασης, ο μύκητας μπορεί να αναπτύσσεται σε σχεδόν όλα τα μέρη της ρίζας.

➤ **Παραγωγή ενζύμων**

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι ένζυμα όπως οι χιτινάσες και οι γλυκανάσες που παράγονται από τους βιολογικούς παράγοντες είναι υπεύθυνα για την καταστολή του παθογόνου. Αυτά τα ένζυμα προκαλούν διάσπαση των πολυσακχαριτών, της χιτίνης, και β-γλυκανών (οι οποίες είναι υπεύθυνες για την άκαμπτη δομή του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων), με συνέπεια τη λύση των υφών του. Οι Metcalf και Wilson (2001) περιέγραψαν τον αποικισμό των ριζών κρεμμυδιού ,προσβεβλημένων με *Sclerotium cepivorum*, από το *T. koningii*. Υφές του μύκητα *T. koningii* εισήλθαν εντός της προσβεβλημένης ρίζας για να καταστρέψουν τις υφές του παθογόνου, προκαλώντας λίγη ή καθόλου ζημία σε μη προσβεβλημένους ιστούς των φυτών. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή ενδο- και εξω-χιτινασών από το μύκητα *T. koningii*.

Σε μια άλλη μελέτη, (Woo *et al.*, 1999) η χιτινάση (ech42) σε μεταλλαγμένα στελέχη του *T. harzianum* (P1) έδειξε μειωμένη δραστηριότητα έναντι του *Botrytis cinerea* σε φύλλα σόγιας. Ωστόσο, το μεταλλαγμένο στέλεχος ήταν εξίσου αποτελεσματικό με τον άγριο τύπο κατά του *P. ultimum* και εμφάνισε αυξημένη δραστηριότητα έναντι του *R. Solani*.

Η δράση έναντι φυτοπαθογόνων οργανισμών είναι πολύπλοκη διαδικασία και εμπλέκεται τόσο ο τροφικός ανταγωνισμός, η κατάληψη ζωτικού χώρου, η παραγωγή ενζύμων και αντιβιοτικών. Η βιοσύνθεση ενζύμων ως μηχανισμός της βιολογικής αντιμετώπισης δεν επαρκεί για να αποδώσει πλήρως τα αποτελέσματα να εξηγήσει την συνέργεια μεταξύ ενζύμων και αντιβιοτικών.

Οι Di Pietro *et al.* (1993) μελέτησαν τα αποτελέσματα της συνεργιστικής δράσης της ενδοχτινάσης και της γλυτοτοξίνης για τη βλάστηση των κονιδίων του *B. cinerea*, και βρήκαν ότι η αντιμετώπιση της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας *B. cinerea* με το συνδυασμό αυτό ήταν πολύ πιο αποτελεσματική απ' ό,τι η δράση του ενζύμου ή του αντιβιοτικού.

➤ Πρόκληση εναγόμενης άμυνας των φυτών

Ένας άλλος μηχανισμός που προτείνεται για να εξηγήσει τη βιολογική αντιμετώπιση με είδη του γένους *Trichoderma* sp. είναι εκείνος της αντίστασης του φυτού ξενιστή μετά από εμβολιασμό αυτού με τον βιολογικό παράγοντα. Αυτή η ιδέα υποστηρίχτηκε από τους Yedidia *et al.* (1999), οι οποίοι απέδειξαν ότι εμβολιασμός ριζών σποροφύτων αγγουριάς 7 ημερών σε ασηπτικό υδροπονικό σύστημα με σπόρια του *T. harzianum* (T-203) (συγκέντρωσης 10^5 ανά ml) πυροδότησε αμυντικές αντιδράσεις και στις ρίζες και στα φύλλα των εμβολιασμένων φυτών. Οι υφές του μύκητα διείσδυσαν την επιδερμίδα και τον ανώτερο φλοιό της ρίζας του αγγουριού ως συνέπεια του εμβολιασμού παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης (συχνά συνδέονται με την παραγωγή μυκοτοξικών ενώσεων), την αύξηση της δραστηριότητας της χιτινάσης, και την απόθεση καλλόζης επί της εσωτερικής επιφανείας του κυτταρικού τοιχώματος. Αύξημένη δραστηριότητα του ενζύμου υπεροξειδάση παρατηρήθηκε και στις ρίζες και τα φύλλα. Αργότερα, οι (Yedidia *et al.*, 2000) έδειξαν ότι ο εμβολιασμός των ριζών αγγουριού με *T. harzianum* (T-203) προκαλεί στο μέρος των φυτών την παραγωγή ενός αριθμού πρωτεϊνών και υδρολυτικών ενζύμων.

Οι Howell *et al.* (2000) έδειξαν ότι η επικάλυψη των σπόρων του βάμβακος με σκευάσματα του βιολογικού παράγοντα αντιμετώπισης ασθενειών *T. virens* (G-6, G-11, G6-5) ή εφαρμογή του διηθήματος *T. virens* σε καλλιέργεια βάμβακος προκάλεσε τη σύνθεση σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις των τερπενοειδών δεσοξυχημιγκοσιπόλ (DHG), χεμιγκοσιπόλ (Hg), και γκοσιπόλ (G) στις αναπτυσσόμενες ρίζες από ό,τι της ρίζας του μάρτυρα. Το γκοσιπόλ (G) ήταν τοξικό μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ ανάμεσα στα DHG και HG ήταν ισχυρά ανασταλτικό για τη δράση του παθογόνου *R. solani*, σε φυτάρια βάμβακος, σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Είδη του γένους *Trichoderma* ήταν πολύ περισσότερο ανθεκτικά σε τερπενοειδή του βάμβακος. Η βιολογική αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλεί ο μύκητας *R. solani* ήταν άκρως συσχετιζόμενη με την επαγωγή της σύνθεσης των τερπενοειδών στις ρίζες βαμβακιού (που προκαλούν είδη του γένους *Trichoderma* sp.)

ακόμη και μεταξύ στελεχών του *T. virens* που δε παρασίτησαν στο παθογόνο και δεν παρήγαγαν αντιβιοτικό. Επιπροσθέτως η σύνθεση τερπενοειδών, σε ρίζες βαμβακιού που έχουν αποικίσει οι παράγοντες βιολογικής αντιμετώπισης με *T. virens* επάγεται σημαντικά από τα υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας της υπεροξειδάσης.

➤ **Μεταβολισμός διεγερτών φύτρωσης**

Ένας άλλος μηχανισμός που έχουν υιοθετήσει είδη του *Trichoderma* sp. για να επικρατήσουν έναντι φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Η αντιμετώπιση ασθενειών του λαιμού σπορόφυτων βαμβακιού που προκαλούνται από τα παθογόνα *P. ultimum* και ελέγχονται από το *T. virens* (G6, G6-5) οφείλεται σε μεταβολισμό των διεγερτών βλαστήσεως που παράγονται στους σπόρους (Howell, 2002). Αυτές οι ενώσεις συνήθως επάγουν την ανάπτυξη των παθογόνων. Ο έλεγχος των ασθενειών θα μπορούσε να γίνει με ιθαγενή στελέχη ή με μεταλλαγμένα στελέχη των βιολογικών παραγόντων τα οποία είναι ανεπαρκή για μυκοπαρασιτισμό, παραγωγή αντιβιοτικού και επαγωγή της σύνθεσης τερπενοειδών στις ρίζες βαμβακιού. Η σημασία του μεταβολισμού του διεγερτών από τον παράγοντα βιολογικής αντιμετώπισης ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι οι ποικιλίες βαμβακιού που δεν παράγουν διεγέρτες αύξησης παθογόνου είναι σχεδόν άνοσες στην ασθένεια.

➤ **Μηχανισμοί προσθήκης**

Τα είδη του γένους *Trichoderma* sp. εμφανίζουν και άλλα χαρακτηριστικά κατά την αλληλεπίδραση τους με τον ξενιστή που μπορούν να συμβάλλουν στην αντοχή ή ανοχή στις ασθένειες. Αυτά τα χαρακτηριστικά εκδηλώνονται στις ρίζες και τους βλαστούς των φυτών, αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές πιέσεις, και αλλαγές στη διατροφική κατάσταση του φυτού. Η φύτευση επικαλυμμένων σπόρων αραβοσίτου με σπόρια *T. harzianum* (T-22) σε έδαφος με χαμηλό άζωτο και είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη ανάπτυξη των φυτών στο πρώτο μέρος της καλλιεργητικής περιόδου (Harman, 2000). Τα φυτά αυτά είχαν μεγαλύτερη διάμετρο στελέχους και αυξημένες αποδόσεις.

Επιπλέον έχει αναφερθεί ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ *T. harzianum* (T-22) και του βακτηρίου *Bradyrhizobium japonicum* (Harman, 2001). Η επεξεργασία της σόγιας με το συνδυασμό αυτόν έχει τονώσει την ανάπτυξη των ριζών αποτελεσματικά. Θεωρητικά, ο συνδυασμός ενός αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου και ενός μύκητα που επιτρέπει στο φυτό να αξιοποιήσει το άζωτο πιο αποτελεσματικά θα πρέπει να μειώσει ακόμη περισσότερο τις απαιτήσεις της καλλιέργειας σε αζωτούχο λίπανση. Επίσης, οι Yedidia *et al.* (2001) έδειξαν ότι η διαχείριση των φυτών αγγουριάς με *T. Harzianum* (T-203) είχε ως αποτέλεσμα μεγάλη αύξηση της περιοχής του ριζικού συστήματος και συγκεκριμένα του συνολικού μήκους της

ρίζας, και σημαντική αύξηση σε ξηρό βάρος και σε φυλλική επιφάνεια έναντι εκείνης του μάρτυρα.

Σε υδροπονική καλλιέργεια αγγουριού στα φυτά που εμβολιάστηκαν οι ρίζες με το βιολογικό παράγοντα *T. Harzianum* (T-203) παρατηρήθηκε αύξηση στους ιστούς των συγκεντρώσεων των στοιχείων Cu, P, Fe, Zn, Mn, και Na. Επίσης στους βλαστούς των φυτών αυτών, οι συγκεντρώσεις των στοιχείων Zn, P και Mn ομοίως αυξήθηκαν. Η βελτίωση της απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων των φυτών ήταν άμεσα σχετιζόμενη με την ευεργετική επίδραση του *T. harzianum* στην ανάπτυξη του ριζικού συστήματος.

1.3 Απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων

Η παραγωγή υγρών και στερεών αποβλήτων, ως αποτέλεσμα των δραστηριοτήτων του ανθρώπου στον αναπτυγμένο κόσμο, έχει προκαλέσει παγκόσμιο ενδιαφέρον για ανάπτυξη τεχνικών και μεθόδων επεξεργασίας αποβλήτων, αποσκοπώντας στη μείωση της περιβαλλοντικής ρύπανσης, αλλά και στην αξιοποίηση των πάσης φύσεως αποβλήτων (Καραδήμα, 2009).

Τα απόβλητα ορίζονται ως τα "παραπροϊόντα" των ανθρώπινων δραστηριοτήτων, τα οποία αφού δεν έχουν πλέον άμεση χρηστικότητα για τον άνθρωπο, θα πρέπει να διατεθούν στο φυσικό περιβάλλον με ασφαλή τρόπο. Τα απόβλητα διαχωρίζονται σε υγρά και στερεά, ανάλογα με τη βασική τους φύση (στερεή ή υγρή) και προέρχονται από βιομηχανικές, επαγγελματικές, οικιακές, αγροτικές καθώς και άλλες ανθρώπινες δραστηριότητες (Καραδήμα, 2009).

Αστικά λύματα είναι τα υγρά απόβλητα που προέρχονται κυρίως από κατοικίες, γραφεία, καταστήματα κ.λ.π.

Υγρά βιομηχανικά απόβλητα ονομάζονται τα απόβλητα που απορρίπτονται από κτίρια και χώρους που χρησιμοποιούνται για οποιαδήποτε εμπορική ή βιομηχανική δραστηριότητα και τα οποία δεν είναι οικιακά λύματα ή όμβρια ύδατα (οδηγία 91/271/ΕΟΚ 21.05.1991). Είναι δηλαδή τα υγρά απόβλητα των βιομηχανικών ή βιοτεχνικών εγκαταστάσεων, που δημιουργούνται κατά την παραγωγική διαδικασία και μπορεί να περιέχουν υπολείμματα των υλών που χρησιμοποιούνται.

Η επεξεργασία, τόσο των υγρών όσο και των στερεών αποβλήτων, πριν τη διάθεσή τους στους φυσικούς υδάτινους αποδέκτες (θάλασσα, ποτάμια, λίμνες) ή στο υπέδαφος είναι απαραίτητη διαδικασία και πρέπει να γίνεται με τέτοιες προδιαγραφές οι οποίες θα εξασφαλίζουν την ομαλή βιοαποικοδόμησή τους.

Οι αναπτυγμένες χώρες χαρακτηρίζονται από υψηλούς ρυθμούς παραγωγής και κατανάλωσης αγαθών και σε συνδυασμό και με την πληθυσμιακή αύξηση σε παγκόσμιο

επίπεδο, οδηγεί σε παραγωγή αποβλήτων με ρυθμούς πολύ μεγαλύτερους από την ικανότητα της φυσικής αποικοδόμησης. Σημαντική είναι και η αλλαγή της ποιότητας των αποβλήτων τα τελευταία χρόνια. Τα βαρέα μέταλλα, η πιθανή ύπαρξη ραδιενεργών ή χημικών ουσιών στα βιομηχανικά απόβλητα και η ανεξέλεγκτη διάθεση νέων συνθετικών ουσιών που προκύπτουν από την παραγωγική διαδικασία οδηγεί σε απόβλητα με αυξημένη τοξικότητα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, είναι πολλές και σημαντικές οι δυσμενείς περιβαλλοντικές επιπτώσεις που μπορούν να επιφέρουν τα απόβλητα στον εκάστοτε αποδέκτη, καθώς και στην υγεία του ανθρώπου μέσω της τροφικής αλυσίδας αν αναλογιστούμε και το φαινόμενο της βιοσυσσώρευσης, με αποτέλεσμα να παρατηρείται ήδη η υποβάθμιση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου.

Για να έχουμε την αρμονική ύπαρξη του ανθρώπου εντός του περιβάλλοντος στο οποίο διαβίει και για την εξασφάλιση της αειφόρου ανάπτυξης αυτού, η προστασία των φυσικών οικοσυστημάτων και των οργανισμών που διαβιούν σε αυτά, η αποφυγή της μόλυνσης των υπόγειων και επιφανειακών υδάτων, η εξασφάλιση καθαρού πόσιμου νερού, η μείωση της συσσώρευσης τοξικών ρυπαντών στο νερό και στο έδαφος και η εξασφάλιση της δημόσιας υγείας, αποτελούν βασικό στόχο.

Προκειμένου, αφενός να μειωθεί ο όγκος των αποβλήτων και αφετέρου να μετριαστεί η επικινδυνότητά τους μέχρι και την πλήρη αξιοποίησή τους σε διάφορες διεργασίες, η επεξεργασία των αποβλήτων αποτελεί στόχο προκειμένου να έχουμε όλα τα ανωτέρω οφέλη.

1.3.1 Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα

Οι αγροτοβιομηχανίες είναι μονάδες, οι οποίες επεξεργάζονται αγροτικά προϊόντα με στόχο την παραγωγή εδώδιμων αγαθών. Ανάλογα με το είδος των αγαθών που παράγονται κατηγοριοποιούνται ως εξής: α) γαλακτοβιομηχανίες, β), κονσερβοποιίες γ) ζυθοποιίες - οινοποιίες, δ) βιομηχανίες κρέατος ε) βιομηχανίες παραγωγής ζάχαρης και στ) βιομηχανίες παραγωγής ποικίλων τροφών όπως καφές, ρύζι, κλπ.(Νταρακάς, 2006)

Η παραγωγική διαδικασία περιλαμβάνει συνήθως ένα αρχικό στάδιο καθαρισμού της πρώτης ύλης, στάδιο απομάκρυνσης των προσμίξεων, το στάδιο της κύριας επεξεργασίας για την παραγωγή του προϊόντος και το τελικό στάδιο της συσκευασίας. Παράλληλα παράγονται απόβλητα τα οποία προέρχονται από απώλειες πρώτης ύλης, απώλειες προϊόντος, νερά πλύσης, συμπύκνωσης και ψύξης και κυρίως από τα υπολείμματα τα οποία προκύπτουν κατά της επεξεργασία της πρώτης ύλης (Νταρακάς, 2006)

Τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα περιέχουν οργανικό φορτίο σε συγκεντρώσεις που ποικίλουν σημαντικά ανάλογα με την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται, αλλά και ανάλογα με το είδος του παραγόμενου προϊόντος. Σε πολλές περιπτώσεις οι αγροτοβιομηχανίες έχουν

περιοδική λειτουργία κατά τη διάρκεια του έτους, με συνέπεια την εποχιακή παραγωγή αποβλήτων, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη βιολογική τους επεξεργασία.

1.3.2 Μέθοδοι κατεργασίας του νωπού γάλακτος

Στις γαλακτοκομικές βιομηχανίες δεν παράγεται μόνο ένα προϊόν, αλλά συνήθως δύο ή και περισσότερα προϊόντα. Οι μέθοδοι κατεργασίας που ακολουθούνται αποσκοπούν στη βελτίωση, στην εξυγίανση και στην παράταση του χρόνου ζωής του γάλακτος (Καραδήμα, 2009).

Οι βασικές μέθοδοι κατεργασίας πριν την περαιτέρω επεξεργασία του γάλακτος για τη παραγωγή των περισσοτέρων γαλακτοκομικών προϊόντων αναφέρονται παρακάτω.

Παραλαβή και Έλεγχος Νωπού Γάλακτος: Το γάλα μεταφέρεται από τις φάρμες μέσα σε δοχεία ή βυτιοφόρα και παραλαμβάνεται στις μονάδες όπου και υπόκειται σε ποιοτικό έλεγχο.

Διήθηση: Κατόπιν το προϊόν υπόκειται σε διήθηση για να αφαιρεθούν οι ξένες προσμίξεις που τυχόν φέρει και τα αιωρούμενα στερεά που μπορεί να περιέχει από το στάδιο του αρμέγματος μέχρι την παραλαβή του στο εργοστάσιο. Το γάλα αρχικά διέρχεται από πυκνό μεταλλικό πλέγμα το οποίο συγκρατεί ξένα σώματα που τυχόν υπάρχουν και στη συνέχεια διοχετεύεται με αντλία σε φίλτρα διηθητικής επιφάνειας (από πεπιεσμένο βαμβάκι ή ύφασμα), είτε σε λεπτό μεταλλικό δίκτυο. Η διήθηση μπορεί να γίνει είτε με φυσικό τρόπο (με υφασμάτινα φίλτρα, τα οποία επαναχρησιμοποιούνται μετά από καθαρισμό), είτε με μηχανικό τρόπο (με κατάλληλους φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες, ταχύτητας περιστροφής 3.000 - 4.000 rpm/min). Η φυγόκεντρος δύναμη που δημιουργείται έχει ως αποτέλεσμα να συγκεντρωθούν τα διάφορα ξένα σώματα στην περιφέρεια της φυγόκεντρου υπό μορφή λάσπης, η οποία απομακρύνεται κατά διαστήματα είτε χειροκίνητα, είτε αυτόματα.

Αποθήκευση-Ψύξη: Το γάλα μεταφέρεται σε μονωμένες δεξαμενές που είναι υπό ψύξη και αποθηκεύεται εκεί.

Θέρμανση: Όταν πρόκειται για μεγάλες μονάδες είναι απαραίτητη η αποθήκευση του γάλακτος σε σιλό για μερικές ημέρες. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ποιότητα του γάλακτος, τούτο θερμαίνεται για μερικά δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 63-65°C.

Παστερίωση: Με την παστερίωση επιτυγχάνεται η εξουδετέρωση των παθογόνων μικροοργανισμών και ορισμένων βακτηρίων με θερμική επεξεργασία. Αυτή γίνεται είτε σε δεξαμενές ασυνεχούς ροής (χαμηλή παστερίωση) όπου το γάλα παραμένει για 30 min σε θερμοκρασία 63-65°C, είτε σε παστεριωτήρες συνεχούς ροής (υψηλή παστερίωση) όπου εξασφαλίζεται η τυρβώδης ροή του γάλακτος ανάμεσα σε δύο θερμαντικές μεταλλικές πλάκες, οι οποίες διατηρούν τη θερμοκρασία του γάλακτος στους 72-75°C για 15 sec.

Τυποποίηση: Η τυποποίηση πραγματοποιείται με κατάλληλο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα-τυποποιητή και έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό ενός κλάσματος του γάλακτος με ταυτόχρονη απομάκρυνση της παραγόμενης κρέμας και επανακυκλοφορία αυτής στη δεξαμενή αποθήκευσης.

Ομογενοποίηση: Με την ομογενοποίηση μειώνεται το μέγεθος των περιεχόμενων στο γάλα λιπαρών σφαιριδίων, έτσι ώστε να παραμένουν διασκορπισμένα στο υγρό διάλυμα και να μην δημιουργούν στρώμα κρέμας στην επιφάνεια. Ως ομογενοποιημένο χαρακτηρίζεται το γάλα που μετά από παραμονή σε ηρεμία επί 48 ώρες στους 7oC δεν παρουσιάζει ορατό στρώμα κρέμας. Η ομογενοποίηση επιτυγχάνεται με διοχέτευση του γάλακτος υπό πίεση 150-250 atm και θερμοκρασία 60-70oC, μέσα από πολύ λεπτές οπές με αποτέλεσμα τα λιποσφαιρίδια του γάλακτος να κατατμούνται σε σφαιρίδια διαμέτρου 1-2 μm .

Αερισμός: Μέθοδος με την οποία επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των αερίων και των δύσσομων πτητικών ουσιών που μπορεί να περιέχονται στο γάλα.

1.3.3 Τυρόγαλο

Η συνεχώς αυξανόμενη παραγωγή γαλακτοκομικών και τυροκομικών προϊόντων, έχει σαν αποτέλεσμα την υψηλή παραγωγή ορρού τυρογάλακτος (τυρόγαλο). Από την παρασκευή ενός κιλού τυριού, παράγονται εννέα κιλά τυρόγαλου (González , 1996) και με δεδομένο ότι το τυρόγαλο έχει πολύ μικρή περιεκτικότητα σε γάλα, γίνεται εύκολα κατανοητό το πρόβλημα διαχείρισης που δημιουργείται από την παραγωγή του συγκεκριμένου αποβλήτου. Το τυρόγαλο αποτελεί έναν σημαντικό ρυπαντή για το περιβάλλον.

Το τυρόγαλο είναι το υγρό υπόλοιπο που ακολουθεί την καθίζηση και την απομάκρυνση της καζεΐνης του γάλακτος κατά τη διαδικασία παραγωγής τυριού . Το παραπροϊόν αυτό, αντιπροσωπεύει περίπου το 85-95% του όγκου του γάλακτος και συγκρατεί περίπου το 55% από τα θρεπτικά του συστατικά. Από αυτά σε μεγαλύτερη αφθονία απαντάται η λακτόζη (4,5-5% w/v), οι διαλυτές πρωτεΐνες (0,6-0,8% w/v), τα λιπίδια (0,4-0,5% w/v) και τα μεταλλικά άλατα (8-10% του ξηρού εκχυλίσματος), ενώ αποτελείται κατά 93% από νερό (Mishra *et al.*, 2000). Τα μεταλλικά άλατα του τυρόγαλου είναι κυρίως χλωριούχο νάτριο και χλωριούχο κάλιο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% και άλατα του ασβεστίου. Στο τυρόγαλο βρίσκονται και άλλα συστατικά σε πολύ μικρότερες αναλογίες, όπως γαλακτικό και κιτρικό οξύ, μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις όπως ουρία και ουρικό οξύ και βιταμίνες του συμπλέγματος B (Venetsaneas *et al.*, 2009 and González Siso, 1996).

Το είδος του τυρόγαλου που προκύπτει κάθε φορά, εξαρτάται από την παραγωγική διαδικασία και την καθίζηση της καζεΐνης και διακρίνεται είτε σε όξινο (pH <5) είτε σε

βασικό (pH 6-7). Το όξινο συνήθως περιέχει λιγότερες πρωτεΐνες και χρησιμοποιείται πολύ περιορισμένα για βρώση λόγω της όξινης γεύσης του και της υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα (Mawson, 1994).

Σε ορισμένες έρευνες έχει βρεθεί ότι το τυρόγαλο περιέχει σε πολύ μικρές ποσότητες και μερικά βαρέα μέταλλα. Σε έρευνα των Cimino *et al.* (1990), σε δεξαμενές με απόβλητο τυρόγαλο μαζί με νερό που χρησιμοποιούνταν για καθαριστικούς σκοπούς, βρέθηκαν κάδμιο, χρώμιο, χαλκός, υδράργυρος, μόλυβδος και ψευδάργυρος. Σε πρόσφατη έρευνα, βρέθηκαν επίσης βαρέα μέταλλα (μόλυβδος, κάδμιο και αλουμίνιο) σε σκόνη τυρόγαλου (Ayar *et al.*, 2009). Λαμβάνοντας υπόψη τις τοξικές επιδράσεις των βαρέων μετάλλων στους οργανισμούς, γίνεται αντιληπτός ο ρόλος του τυρόγαλου ως ρυπαντή και η αναγκαιότητα παρακολούθησης των αποβλήτων αυτών, προκειμένου να μετριαστούν οι αρνητικές τους επιπτώσεις.

1.3.4 Απόβλητα τυροκομικών μονάδων και περιβαλλοντικές επιπτώσεις

Η οργανική προέλευση των αποβλήτων των τυροκομείων, το αυξημένο οργανικό τους φορτίο και το γεγονός ότι δε διαλύονται στο νερό τα κατατάσσει στα ιδιαίτερα ρυπογόνα απόβλητα. Η συνήθης δε απόρριψή τους στους κοντινούς υδάτινους αποδέκτες (ποτάμια, ρεματιές, λίμνες), στις περισσότερες περιπτώσεις χωρίς να έχει προηγηθεί η επεξεργασία τους σε βιολογικό καθαρισμό, προκαλεί τεράστια προβλήματα ρύπανσης των υπογείων υδάτων λόγω της τοξικότητας των αποβλήτων, καθώς και μία γενικότερη υποβάθμιση του περιβάλλοντος γύρω από τα τυροκομεία (Καραδήμα, 2009).

Παρατηρείται δυσοσμία, υποβάθμιση της ποιότητας των νερών και του περιβάλλοντος και σοβαρές επιπτώσεις στους υδρόβιους ζωικούς οργανισμούς. Το φαινόμενο του ευτροφισμού στα σημεία απόρριψης των αποβλήτων αυτών, λόγω της έλλειψης οξυγόνου που παρατηρείται, εφ' όσον αυτό δεσμεύεται από ομάδες μικροοργανισμών που αναπτύσσονται και επικρατούν σε αυτούς τους αποδέκτες, οδηγεί στο θάνατο πολλών ειδών ψαριών και ασπονδύλων. Να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τη νομοθεσία (Π.Δ. 252, Κ.Υ.Α. 5673/400/97) η εγκατάσταση βιολογικού καθαρισμού είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των τυροκομικών μονάδων και επομένως αποτελεί βασική και αναγκαία προϋπόθεση για την αρχική τους αδειοδότηση (Καραδήμα, 2009).

Παρ' όλα αυτά, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων τέτοια εγκατάσταση, είτε δεν υπάρχει, είτε δε λειτουργεί με αποτέλεσμα τα υγρά απόβλητα να απορρίπτονται ανεπεξέργαστα είτε στο έδαφος είτε σε υδάτινα οικοσυστήματα. Πολλές είναι οι περιπτώσεις όπου η απόρριψη των υγρών αποβλήτων των τυροκομείων έχει απασχολήσει την κοινή γνώμη και έχει οδηγήσει σε έντονες διαμαρτυρίες έναντι των μονάδων και των αρμόδιων θεσμικών φορέων.

Χαρακτηριστικό το παράδειγμα των επιπτώσεων σε έναν παραπόταμο του Πηνειού ποταμού, ο οποίος δέχεται περίπου 700 τόνους τυρογάλας το χρόνο από τα 60 περίπου τυροκομεία του νομού Λάρισας (Καραδήμα, 2009).

Σε πολλές μάλιστα περιπτώσεις τα απόβλητα των τυροκομείων σε συνδυασμό με την απόρριψη και άλλων αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων στις ίδιες περιοχές, όπως είναι αυτά των ελαιοτριβείων, επιφέρει σημαντικότερα προβλήματα στο περιβάλλον.

1.3.5 Απόβλητα γαλακτοκομικών μονάδων και περιβαλλοντικές επιπτώσεις

Τα απόβλητα των γαλακτοβιομηχανιών διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

Αέριες εκπομπές

Αέριες εκπομπές στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελούν τα καυσαέρια, τα αιωρούμενα σωματίδια, οι χλωροφθοράνθρακες (CFCs) και οι οσμές (Νταρακάς, 2006)

Υγρά απόβλητα

Τα υγρά απόβλητα των γαλακτοβιομηχανιών περιέχουν κυρίως γάλα ή προϊόντα γάλακτος καθώς και διάφορες απορρυπαντικές ουσίες και παρουσιάζουν πολύ υψηλό οργανικό φορτίο, υψηλά επίπεδα αζώτου (N) και φωσφόρου (P) και διακυμάνσεις ως προς την θερμοκρασία και το pH, λόγω της παρουσίας βασικών και όξινων χημικών ουσιών καθαρισμού. Ο όγκος και η συγκέντρωση των αποβλήτων των γαλακτοβιομηχανιών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ο τύπος και η ποσότητα των προϊόντων, η διαδικασία και ο μηχανολογικός εξοπλισμός παραγωγής, οι πρακτικές καθαρισμού κ.λ.π. (Νταρακάς, 2006).

Οι κυριότερες πηγές επιβάρυνσης των υγρών αποβλήτων προέρχονται από:

- ✓ τα νερά πλύσης των δεξαμενών γάλακτος, γραμμών παραγωγής, μηχανημάτων, δαπέδων, βυτιοφόρων ή δοχείων μεταφοράς γάλακτος
- ✓ τις απώλειες γάλακτος κατά την παραγωγική διαδικασία (π.χ. παραλαβή, αποθήκευση, διαύγαση, παστερίωση, κ.λ.π.)
- ✓ την διάθεση τυρογάλακτος, βουτυρογάλακτος στα απόβλητα.

Υπάρχουν έξι συστήματα με τα οποία μπορούμε να διαχειριστούμε τα υγρά απόβλητα και τα οποία αναλύονται παρακάτω (Γεωργιοπούλου, 2007):

1. Συστήματα επεξεργασίας ή πρωτογενούς επεξεργασίας

- Δεξαμενές εξισορρόπησης/ ομογενοποίησης
- Εξουδετέρωση/ ρύθμιση pH
- Μηχανικός καθαρισμός/ εσχάρωση και λεπτό κοσκίνισμα (περιστροφικά κόσκινα)
- Λιποσυλλογή και εξαφρισμός
- Επίπλευση (DAF)

- ο Αμμοσυλογή
- 2. Συστήματα βιολογικής επεξεργασίας
 - ο Αερόβια συστήματα
 - ο Αντιδραστήρες ενεργού ιλύος
 - ο Βιολογικά φίλτρα, βιολογικοί δίσκοι
 - ο Αναερόβια συστήματα
 - ο Δεξαμενές - λίμνες σταθεροποίησης
- 3. Συστήματα χημικής επεξεργασίας
 - ο Απολύμανση με χλώριο
- 4. Συστήματα φυσικής επεξεργασίας
 - ο Φίλτρα άμμου
- 5. Συστήματα επεξεργασίας/ διάθεσης στο έδαφος, όπου είναι διαθέσιμες μεγάλες εκτάσεις (για ημι-επεξεργασμένα απόβλητα)
- 6. Άρδευση.

Τα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα μπορούν να διατίθενται για άρδευση αγροτεμαχίων όπως ορίζεται στον κώδικα ορθής γεωργικής πρακτικής (ΦΕΚ Β' 477/2000) και στον οποίο αναφέρεται η χρήση του ανακυκλωμένου νερού για σκοπούς άρδευσης (Νταρακάς, 2006)

Στερεά απόβλητα

Τα στερεά απόβλητα τα διαχωρίζουμε σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τις παραγωγικές διαδικασίες που ακολουθούνται:

- Στερεά απόβλητα από παραγωγικές διαδικασίες

Τα στερεά απόβλητα που προκύπτουν από την παραγωγική διαδικασία των γαλακτοβιομηχανιών είναι στερεά από τη διαδικασία διαύγασης του γάλακτος και στερεά τρίμματα τυρόμαζας τυροπήγματος (Νταρακάς, 2006)

- Στερεά απόβλητα (ιλύς) από διεργασίες βιολογικών καθαρισμών

Σημαντική ποσότητα στερεών αποβλήτων αποτελούν τα ιζήματα που προέρχονται από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται τα στερεά υπολείμματα του εσχαρισμού, και το πλεόνασμα της βιομάζας από τους διαυγαστήρες των εγκαταστάσεων βιολογικής επεξεργασίας. Η ιλύς από το σύστημα επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων των γαλακτοβιομηχανιών έχει οικονομική αξία, λόγω του υψηλού περιεχομένου της σε θρεπτικά συστατικά. Η υγρή λάσπη που παράγεται κατά την βιολογική επεξεργασία των αποβλήτων με την κατάλληλη επεξεργασία μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως εδαφοβελτιωτικό. Για την επεξεργασία της ιλύος μπορεί να χρησιμοποιηθεί αναερόβια χώνευση (Νταρακάς, 2006)

- Στερεά απορρίμματα συσκευασίας

Οι κατεστραμμένες συσκευασίες δεν πρέπει να θεωρούνται αμελητέες. Τα ακατάλληλα συσκευασμένα γαλακτοκομικά προϊόντα συνήθως επιστρέφονται για επανεπεξεργασία, αλλά η συσκευασία τους απορρίπτεται. Οι συσκευασίες παστεριωμένου ή U.H.T. γάλακτος μπορεί να είναι χάρτινα κουτιά με εσωτερική πλαστική επένδυση (tetrapack) ή πλαστικά μπουκάλια. Το βούτυρο συσκευάζεται σε μεταλλικά ή πλαστικά δοχεία και το τυρί σε ξύλινα βαρέλια, μεταλλικά ή πλαστικά δοχεία και για μικρότερες συσκευασίες σε πλαστική μεμβράνη ή λεπτό έλασμα. Η σκόνη γάλακτος συνήθως συσκευάζεται σε χάρτινους σάκους ή μεταλλικές κονσέρβες και το συμπυκνωμένο γάλα σε μεταλλικές κονσέρβες. (Νταρακάς, 2006).

Επεξεργασία στερεών αποβλήτων

Η διάθεση των στερεών διαύγασης (διήθησης - φυγοκέντρισης) του γάλακτος πρέπει να γίνεται στα στερεά και όχι στα υγρά απόβλητα. Απαραίτητη είναι επίσης η επιλογή κατάλληλου συστήματος επεξεργασίας και διαχείρισης της ιλύος, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της, δηλαδή πάχυνση, σταθεροποίηση, αφυδάτωση με φιλτρόπρεσσα ή σε κλίνες ξήρανσης και ασφαλής διάθεση (επεξεργασμένης ιλύος και μη αξιοποιήσιμων στερεών) σε χώρο διάθεσης απορριμμάτων (υγειονομική ταφή). Θα πρέπει ακόμα να γίνεται διερεύνηση πιθανής χρήσης της ιλύος για παραγωγή βιοαερίου μετά από αναερόβια χώνευση.

Τα στερεά απόβλητα παρόμοιας σύστασης με τα αστικά (πλαστικό και χαρτί) θα πρέπει να συλλέγονται χωριστά και να υφίστανται ανακύκλωση. (Νταρακάς, 2006).

1.4 Σκοπός της εργασίας

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φάνηκε πως υπάρχει κενό αναφορικά με το κατά πόσο θα μπορούσαν τα απόβλητα από βιολογικό καθαρισμό γαλακτοβιομηχανίας να αποτελέσουν υπόστρωμα ανάπτυξης του ανταγωνιστή μύκητα *Trichoderma*. Αυτό ακριβώς το κενό που υπήρχε στη βιβλιογραφία η διατριβή αυτή έχει ως σκοπό να το καλύψει.

Στην παρούσα διατριβή θα γίνει προσπάθεια να διερευνηθεί, κατά πόσο μπορεί ο μύκητας *Trichoderma* ο οποίος θα αναπτυχθεί σε υπόστρωμα που ως πρώτη ύλη θα έχει την ιλύ βιολογικού καθαρισμού από λύματα γαλακτοβιομηχανίας, να επιδράσει στη βιωσιμότητα των μικροσκληρωτίων του μύκητα *Vetricillium dahliae*.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας

Η πρώτη ύλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν επεξεργασμένα απόβλητα (προϊόν βιολογικού καθαρισμού) της γαλακτοβιομηχανίας ΤΡΙΚΚΗ με έδρα τα Τρίκαλα. Από την έξοδο της δεξαμενής συγκέντρωσης του βιολογικού καθαρισμού της βιομηχανίας (εικόνα 2.1.1) συλλέχτηκαν 9 lt υλικού. Το υλικό ήταν θολό (εικόνα 2.1.2), και σε σύντομο χρονικό διάστημα διαχωρίστηκε σε δύο φάσεις: ίζημα (στερεή φάση) και υπερκείμενο (υγρή φάση).



Εικόνα 2.1.1. Δεξαμενή συγκέντρωσης αποβλήτων της βιομηχανίας ΤΡΙΚΚΗ



Εικόνα 2.1.2. Υγρά απόβλητα από το βιολογικό καθαρισμό της γαλακτοβιομηχανίας (είναι εμφανή η θολή όψη του)



Εικόνα 2.1.3. Κάδος αποθήκευσης αποξηραμένων αποβλήτων μετά από αφυδάτωση.



Εικόνα 2.1.4. Αποξηραμένη ιλύ (στερεή φάση) μετά από αφυδάτωση

2.1.1 Διαχωρισμός - επεξεργασία φάσεων

Οι δυο φάσεις των αποβλήτων διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού whatman. Τόσο η υγρή όσο και η στερεή φάση μοιράστηκαν σε κωνικές φιάλες (100 ml υγρής φάσης και 150 ml μίξη στερεής με υγρής ανά κωνική) και ακολούθησε αποστείρωση σε οικιακού τύπου αυτόκαυστο για 20 λεπτά (εικόνα 2.1.1.1). Μετά την αποστείρωση 50 ml της στερεής φάσης μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου Falcon και φυγοκεντρήθηκαν σε 4500 xg για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης προέκυψαν 10 ml στερεού ιζήματος και περίπου 40 ml υγρού (εικόνες 2.1.1.2).



Εικόνα 2.1.1.1 Η ιλύς που συλλέχθηκε από το διηθητικό χαρτί μετά την αποστείρωση .



Εικόνα 2.1.1.2 Στερεή φάση και υγρό υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση .

2.2 Μικροοργανισμοί

Στο εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπήρχαν απομονώσεις *Trichoderma* sp (άγνωστης προέλευσης) και *Vetricillium dahliae* που απομονώθηκε από ασθενές δέντρο ελιάς . Οι απομονώσεις διατηρούνταν σε θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) (ζωμό πατάτας 20%, δεξτρόζη 1,5% ω/ν, άγαρ 1,5% ω/ν).

2.3 Διαχείριση του μύκητα *Trichoderma* sp. με την ιλύ αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας

2.3.1 Ανάπτυξη *Trichoderma* sp. σε ιλύ αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας

Η ιλύ των αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας διαχωρίστηκε και αποστειρώθηκε, όπως περιγράφηκε στη 2.1.1 παράγραφο. Στη συνέχεια στρώθηκαν 12 τρυβλία Petri με την αποστειρωμένη ιλύ ασηπτικά σε θάλαμο στρωτής ροής αέρα (Laminar air flow). Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν περίπου 20ml ιλύος προκειμένου να επιτευχθεί μια ομαλή-ομοιόμορφη στρώση (εικόνα 2.3.1.1). Τρία τρυβλία στρώθηκαν μόνο με PDA (Potato Dextrose Agar) αποτελώντας το μάρτυρα .



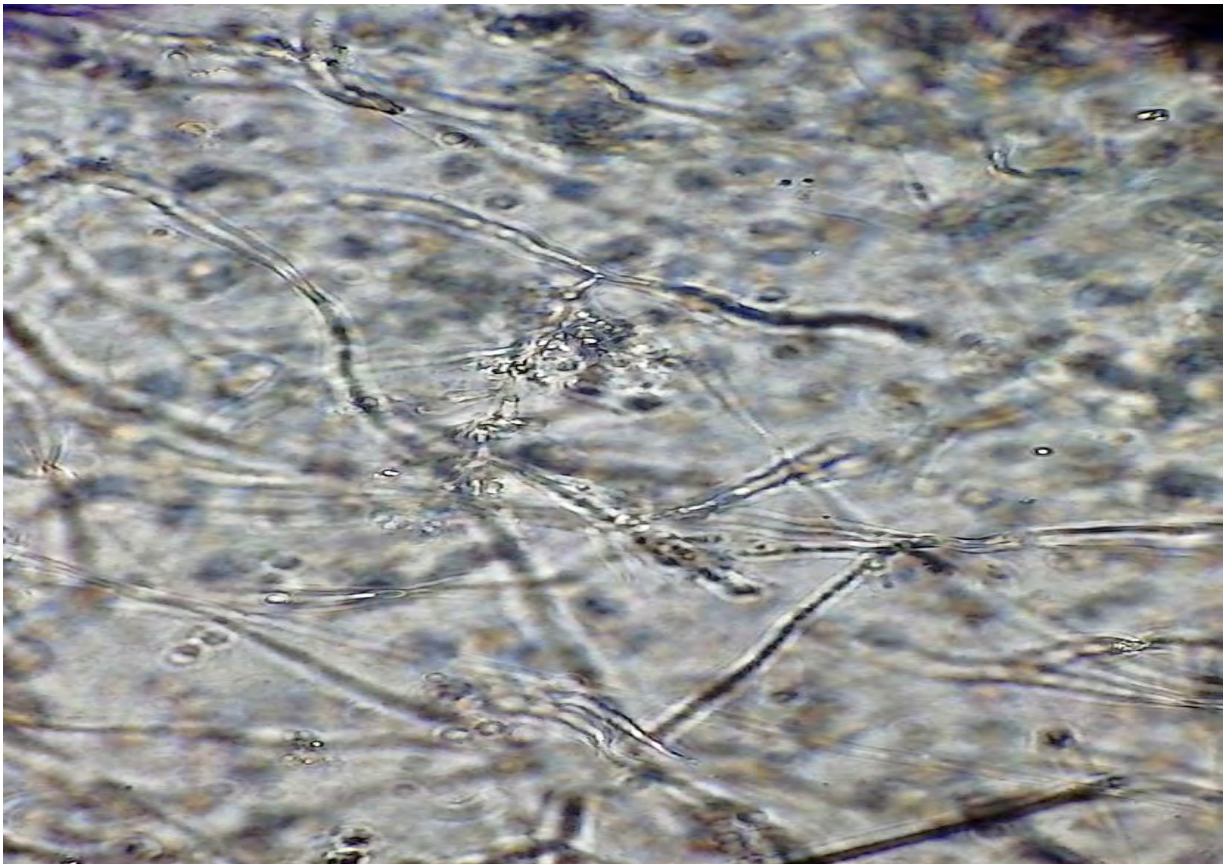
Εικόνα 2.3.1.1 Ομοιόμορφη στρώση τρυβλίου με ιλύ

Ακολούθησε η διαδικασία λήψης σπορίων του μύκητα *Trichoderma* sp. από τους δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι βρίσκονται στο θάλαμο καλλιέργειών και ο προσδιορισμός της πυκνότητας σπορίων τους .

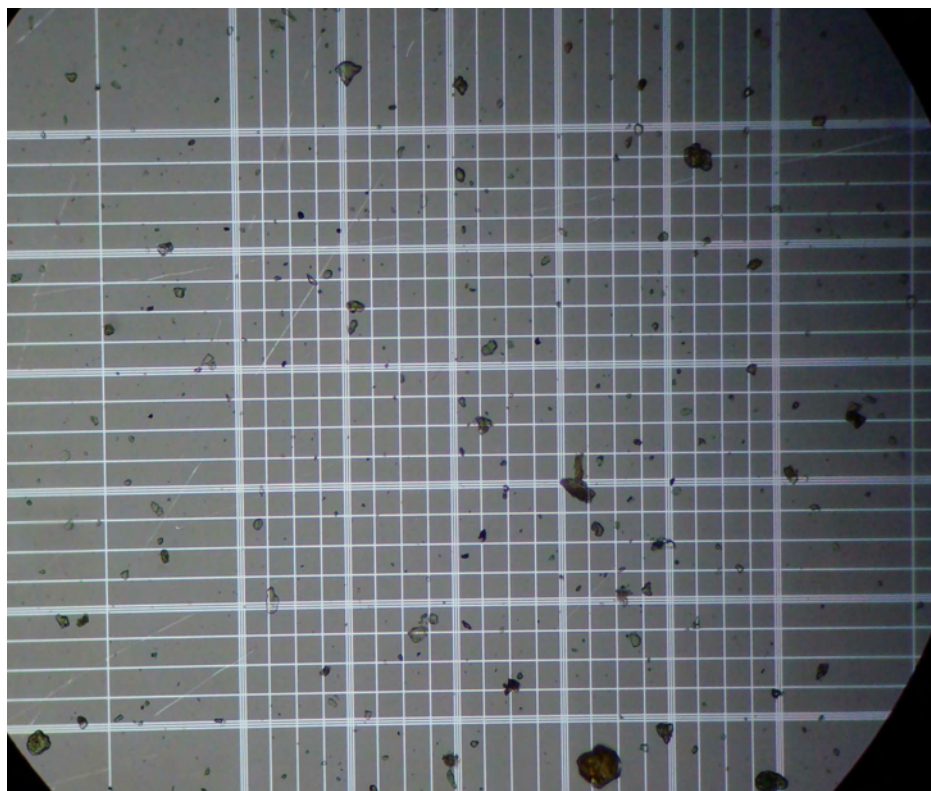
Η ανωτέρω διαδικασία είχε ως ακολούθως : Καταρχήν όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά σε οικιακού τύπου αυτόκαυστο, και επιπλέον όλη αυτή η διαδικασία τελέστηκε ασηπτικά σε θάλαμο στρωτής ροής αέρα (Laminar air flow). Έτσι ελήφθησαν με ογκομετρικό σωλήνα 5 ml sdi νερό (απιονισμένο νερό) το οποίο εισήχθη σε ένα αποστειρωμένο φιαλίδιο των 14 ml . Ακολούθως αυτό ρίχτηκε μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο υπήρχε ο μύκητας (εικόνα 2.3.1.3) και με μια λαβίδα αποστειρωμένη αναμοχλεύτηκε το διάλυμα που προέκυψε (κονίδια του μύκητα και sdi νερό). Το μίγμα αυτό διοχετεύτηκε σε ένα γυάλινο φιαλίδιο στο στόμιο του οποίου υπήρχε ένα μικρό χωνάκι και ένα διπλά τυλιγμένο τουλπάνι. Μέσα στο βαζάκι υπήρχαν τα κονίδια του μύκητα. Τελειώνοντας η διήθηση έγινε και ο προσδιορισμός της πυκνότητας των σπορίων του μύκητα που υπήρχε στο διάλυμα με την βοήθεια του αιματοκυτταρόμετρου (Hemocytometer). Με τη βοήθεια μιας πιπέτας των 50 μl τοποθετήθηκαν 2 ισομεγέθεις σταγόνες στο πλακίδιο Neubauer και εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο (εικόνα 2.3.1.4). Εκεί μετρήθηκαν σε κάθε τετραγωνίδιο πόσα κονίδια είχαν εξαιρουμένης της κάτω πλευράς και της κάθετης δεξιάς .



Εικόνα 2.3.1.2 Ο αποστειρωμένος ειδικός χώρος με χρήση ακτινοβολίας (UV) - (Laminar)



Εικόνα 2.3.1.3 Παρασκεύασμα από το δοκιμαστικό σωλήνα . Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας *Trichoderma* s.p



Εικόνα 2.3.1.4 Αιματοκυτταρόμετρο (Hemocytometer) από μικροσκόπιο .Διακρίνεται ο σταυρός των 25 τετραγωνιδίων στο κέντρο στα οποία γίνεται η μέτρηση

Τελικά μετά από την ανωτέρω διαδικασία βρέθηκε πως υπήρχε μια πυκνότητα σπορίων της τάξης των $1,76 \times 10^7$ σπόρια / ml.

Στα 15 τρυβλία (12 με ιλύ και 3 με PDA) έγινε σημειακή εναπόθεση, στο κέντρο του τρυβλίου, σταγόνας αιωρήματος 100 μl σπορίων του μύκητα *Trichoderma* sp.. Τα τρυβλία αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη του μύκητα.

2.3.2 Ανάπτυξη *Trichoderma* sp. σε ιλύ αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας με προσθήκη ουρίας

Σε άλλο πείραμα, εκτός από τον εμβολιασμό με σπόρια του μύκητα *Trichoderma* sp. σε τρυβλία με ιλύ από το βιολογικό καθαρισμό της γαλακτοβιομηχανίας, προστέθηκε και λίπασμα ουρία (46-0-0).

Συγκεκριμένα μετά τον διαχωρισμό των φάσεων της ιλύος όπως περιγράφηκε προηγούμενα , στρώθηκαν 15 τρυβλία με ιλύ . Τα 12 τρυβλία εμβολιάστηκαν με 100μl αιωρήματος σπορίων του μύκητα *Trichoderma* sp. με πυκνότητα $2,5 \times 10^7$ σπόρια / ml και ακολούθως προστέθηκε ουρία στις παρακάτω συγκεντρώσεις :

% ουρία	τρυβλία
0,3	2
0,25	2
0,2	2
0,15	2
0,1	2
0,05	2
0	3

Σε τρία τρυβλία δεν προστέθηκε ουρία (μάρτυρας). Ζυγίζοντας το άδειο τρυβλίο και στη συνέχεια το στρωμένο τρυβλίο με την ιλύ, βρέθηκε ότι το περιεχόμενο του τρυβλίου ζύγιζε περίπου 11,647 gr ιλύος. Επομένως για την ποσότητα των 11,647 gr ιλύος που υπήρχε σε κάθε τρυβλίο, προστέθηκαν με βάση τη συγκέντρωση που αναφέρθηκε ανωτέρω, και για ένα διάλυμα υγρής ιλύος όγκου 5,45ml στο οποίο περιεχόταν 2 gr ουρίας, οι κάτωθι ποσότητες από το διάλυμα ιλύος ουρίας :

96μl διαλύματος	Ανά τρυβλίο	2 επαναλήψεις
80μl διαλύματος	Ανά τρυβλίο	2 επαναλήψεις
64μl διαλύματος	Ανά τρυβλίο	2 επαναλήψεις
48μl διαλύματος	Ανά τρυβλίο	2 επαναλήψεις
32μl διαλύματος	Ανά τρυβλίο	2 επαναλήψεις
16μl διαλύματος	Ανά τρυβλίο	2 επαναλήψεις

Σύνολο 12 τρυβλία με τον μύκητα και ουρία και 3 τρυβλία ως μάρτυρες , τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 22 βαθμούς κελσίου στο σκοτάδι (εικόνα 2.3.2.1).



Εικόνα 2.3.2.1 Θάλαμος επώασης μυκήτων.

2.3.3 Ανάπτυξη *Trichoderma* sp. σε ιλύ αποβλήτων γαλακτοβιομηχανίας με προσθήκη σακχαρόζης

Εκτός από τον εμβολιασμό με σπόρια του μύκητα *Trichoderma* sp., στα τρυβλία στα οποία υπήρχε ιλύ από το βιολογικό καθαρισμό της γαλακτοβιομηχανίας, προστέθηκε σακχαρόζη.

Μετά τον διαχωρισμό των φάσεων της ιλύος, σε 2 τρυβλία είχαμε μόνο την ιλύ και αποτέλεσαν τον μάρτυρα, και 12 τρυβλία στρώθηκαν με ιλύ, όπου εμβολιάστηκαν με 100μl διαλύματος του μύκητα *Trichoderma* sp. και με μια πυκνότητα σπορίων $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml και ακολούθως προστέθηκε σακχαρόζη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις:

% σακχαρόζη	τρυβλία
2,5	2
2	2
1,5	2
1	2
0,5	2
0	2

Σύνολο 10 τρυβλία με τον μύκητα και σακχαρόζη και 2 τρυβλία ως μάρτυρες, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 22 βαθμούς κελσίου.

2.4 Διαχείριση του μύκητα *Trichoderma* sp. με τα υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας

2.4.1 Ανάπτυξη *Trichoderma* sp. σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας

Τα υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας διαχωρίστηκαν και αποστειρώθηκαν, σύμφωνα με την 2.1.1 παράγραφο. Ακολούθως σε 10 κωνικές φιάλες όγκου 250 ml προστέθηκαν ασηπτικά σε θάλαμο στρωτής ροής αέρα (Laminar air flow) (εικόνα 2.3.1.2), 100 ml υγρών αποβλήτων. Ακολούθησε η διαδικασία λήψης σπορίων του μύκητα *Trichoderma* sp. από τους δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι βρίσκονται στο θάλαμο καλλιέργειών και ο προσδιορισμός της πυκνότητας σπορίων τους όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.3.1. Η πυκνότητα σπορίων ήταν $1,76 \times 10^7$ σπόρια / ml.

Σε 9 κωνικές (μια κωνική υπήρξε μάρτυρας και δεν εμβολιάστηκε) έγινε προσθήκη 100 μl αιωρήματος σπορίων του μύκητα *Trichoderma* sp.. Οι κωνικές τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 22 βαθμούς κελσίου προκειμένου να αναπτυχθεί ο μύκητας.

2.4.2 Ανάπτυξη *Trichoderma* sp. σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας με προσθήκη ουρίας

Σε άλλο πείραμα εκτός από τον εμβολιασμό με σπόρια του μύκητα *Trichoderma* sp., σε κωνικές φιάλες στις οποίες υπήρχαν υγρά απόβλητα από το βιολογικό καθαρισμό της γαλακτοβιομηχανίας, προστέθηκε και λίπασμα ουρία (46-0-0). Σε 10 κωνικές προστέθηκαν 100 ml υγρών αποβλήτων, όπου οι 8 από αυτές αφού εμβολιάστηκαν με 100μl αιωρήματος σπορίων του μύκητα *Trichoderma* sp. με πυκνότητα σπορίων $2,5 \times 10^7$ σπόρια / ml, ακολούθως προστέθηκε ουρία στις ακόλουθες συγκεντρώσεις :

% ουρία	κωνικές
0,2	2
0,15	2
0,1	2
0,05	2
0	2

Επομένως από ένα διάλυμα υγρής ιλύος όγκου 5,45ml στο οποίο περιέχονταν 2 gr ουρίας, προστέθηκαν οι κάτωθι ποσότητες από το διάλυμα ιλύος ουρίας σε κάθε μία από τις 8 κωνικές :

0,545 ml διαλύματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
0,408 ml διαλύματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
0,273 ml διαλύματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
0,136 ml διαλύματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις

Σύνολο 8 κωνικές με τον μύκητα και ουρία και 2 κωνικές ως μάρτυρες , οι οποίες τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα orbital incubator στους 25 βαθμούς κελσίου για ανάπτυξη.

2.4.3 Ανάπτυξη *Trichoderma* sp. σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας με προσθήκη σακχαρόζης

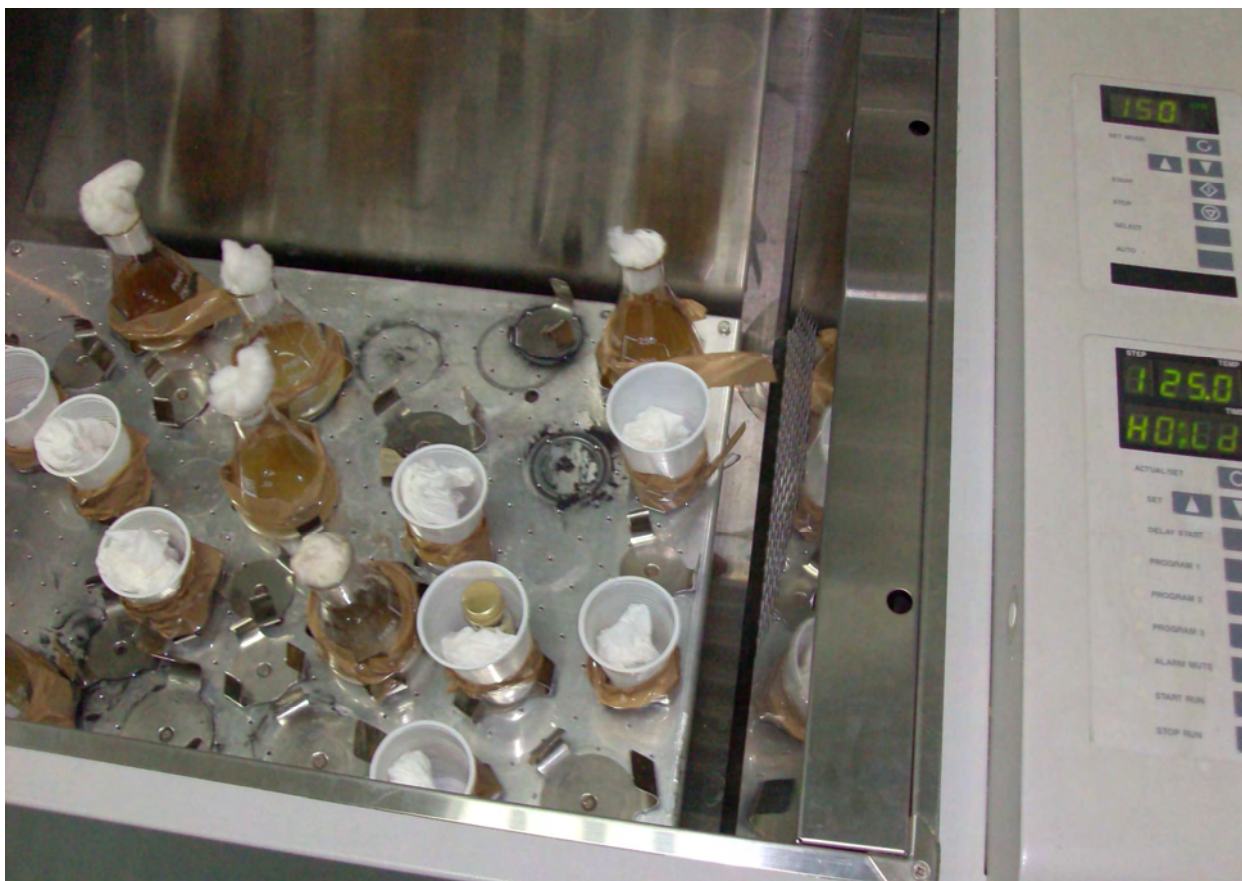
Εκτός από τον εμβολιασμό με σπόρια του μύκητα *Trichoderma* sp., στις κωνικές φιάλες στις οποίες υπήρχαν υγρά απόβλητα από το βιολογικό καθαρισμό της γαλακτοβιομηχανίας, προστέθηκε σακχαρόζη. Σε 12 κωνικές προστέθηκαν 100 ml υγρών αποβλήτων, όπου αφού εμβολιάστηκαν με 100μl αιωρήματος σπορίων του μύκητα *Trichoderma* sp. πυκνότητας $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml, ακολούθως προστέθηκε σακχαρόζη στις ακόλουθες συγκεντρώσεις :

% σακχαρόζη w/v	κωνικές
2,5	2
2	2
1,5	2
1	2
0,5	2
0	2

Συγκεκριμένα από ένα διάλυμα 50ml δι νερό με 10 gr σακχαρόζης, και για όγκο διαλύματος 54ml, ελήφθησαν οι κάτωθι ποσότητες σε κάθε μία από τις 10 κωνικές :

1α -1β	13,5 ml διαλύματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
2α -2β	10,8 ml διαλύματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
3α -3β	8,1 ml διαλύματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
4α -4β	5,4 ml διαλύματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
5α -5β	2,7 ml διαλύματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις

Σύνολο 10 κωνικές με τον μύκητα και σακχαρόζη και 2 κωνικές ως μάρτυρες , τα οποία τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο επωαστικό θάλαμο στους 25 βαθμούς κελσίου (εικόνα 2.4.3.1). Το πείραμα επαναλήφθηκε για ακόμη μια φορά .



Εικόνα 2.4.3.1 Το μηχάνημα orbital incubator .

Επιπλέον ,πέρα από το ανωτέρω, έγινε εκ νέου μια μεταχείριση των υγρών αποβλήτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης. Σε 12 κωνικές με ποσότητα 100 ml υγρών αποβλήτων, αφού εμβολιάστηκαν με 100μl διαλύματος του μύκητα *Trichoderma* sp. και με πυκνότητα σπορίων $3,9 \times 10^7$ σπόρια / ml, ακολούθως προστέθηκε σακχαρόζη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις :

% σακχαρόζη w/v	κωνικές
5	2
4,5	2
4	2
3,5	2
3,0	2

Σύνολο 10 κωνικές με τον μύκητα και σακχαρόζη και 2 κωνικές ως μάρτυρες υγρά απόβλητα και σπόρια *Trichoderma* sp. τα οποία αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Ως μάρτυρας του προηγούμενου πειράματος για την ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το sdi νερό. Στις κωνικές φιάλες υπήρχε sdi νερό, στο οποίο εκτός από τον εμβολιασμό με σπόρια του μύκητα *Trichoderma* sp., προστέθηκε και «σακχαρόζη».

Μετά την προσθήκη sdi νερού στις κωνικές φιάλες, αυτές εμβολιάστηκαν με 100μl διαλύματος του μύκητα *Trichoderma* sp. και με πυκνότητα σπορίων $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml και ακολούθως προστέθηκε σακχαρόζη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις:

% σακχαρόζη w/v	κωνικές
2,5	2
2	2
1,5	2
1	2
0,5	2
0	2

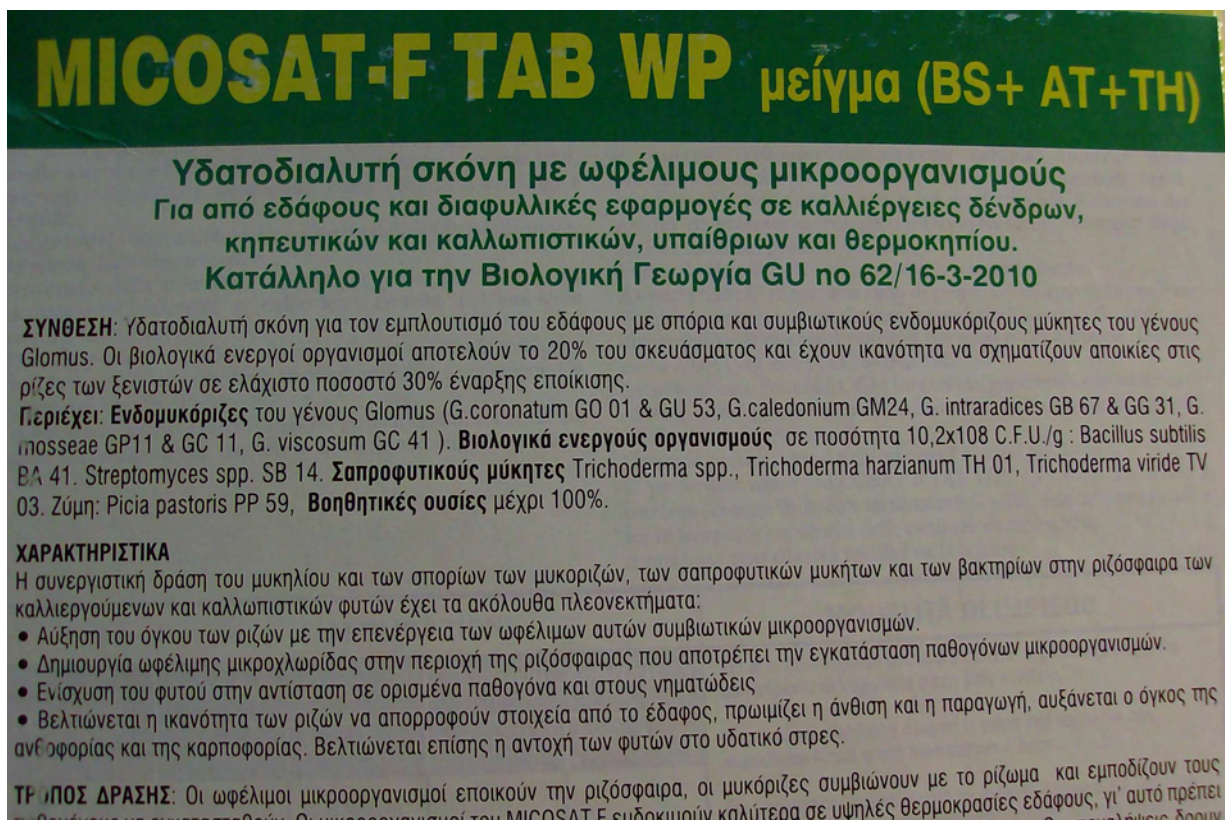
Σύνολο 10 κωνικές με τον μύκητα και σακχαρόζη και 2 κωνικές ως μάρτυρες , οι οποίες τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα orbital incubator στους 25 βαθμούς κελσίου.

2.4.4 Ανάπτυξη ωφέλιμων μικροοργανισμών σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας

Έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ωφέλιμων μικροοργανισμών με την χρησιμοποίηση του σκευάσματος MICOSAT-F WP (εικόνα 2.4.4.1.) όπου ποσότητα από αυτό προστέθηκε σε υγρά απόβλητα του βιολογικού καθαρισμού της γαλακτοβιομηχανίας. Σε 8 κωνικές φιάλες υπήρχαν 100 ml υγρών αποβλήτων, στα οποία προστέθηκε η κάτωθι ποσότητα από το σκεύασμα:

0,02 γρ. σκευάσματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
0,01 γρ. σκευάσματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
0,003 γρ. σκευάσματος	Ανά κωνική	2 επαναλήψεις
Μάρτυρας	-	2 επαναλήψεις

Σύνολο 6 κωνικές με ποσότητα σκευάσματος και 2 κωνικές ως μάρτυρες , τα οποία τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα orbital incubator στους 25 βαθμούς κελσίου.



Εικόνα 2.4.4.1. Το σκεύασμα MICOSAT-F

2.4.5 Ανάπτυξη *Trichoderma* sp. σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας με σακχαρόζη και καλαμιά

Επιχειρήθηκε καλλιέργεια του μύκητα *Trichoderma* sp. σε καλαμιά σιταριού με υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας. Αρχικά η καλαμιά ψιλοκόπηκε (εικόνα 2.4.5.1) και παρήχθει μια αρκετά ικανή ποσότητα για να γεμίσουν 12 τρυβλία.



Εικόνα 2.4.5.1. Ψιλοτεμαχισμός της καλαμιάς σιταριού

Στη συνέχεια ποσότητα ψιλοκομμένης καλαμιάς με τα υγρά απόβλητα αποστειρώθηκαν για μισή ώρα μέσα στο οποίο είχαν προστεθεί και επιπλέον αποστειρώθηκε καλαμιά με σdι νερό αντί υγρών αποβλήτων. Ακολούθως ο αποστειρωμένος πολτός στρώθηκε ασηπτικά σε τρυβλία. Κάθε τρυβλίο εμβολιάστηκε με 100μl αιωρήματος σπορίων του μύκητα *Trichoderma* sp. και με πυκνότητα σπορίων $3,9 \times 10^7$ σπόρια / ml και ακολούθως προστέθηκε σακχαρόζη σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις μόνο σε 6 τρυβλία που είχαν στρωθεί με καλαμιά αποστειρωμένη με υγρά απόβλητα (εικόνα 2.4.5.2).



Εικόνα 2.4.5.2. Αποστειρωμένη καλαμιά σιταριού εμβολιασμένη με *Trichoderma* s.p

Οι συγκεντρώσεις σακχαρόζης / τρυβλίο εμφανίζονται στον κατωτέρω πίνακα:

% σακχαρόζη w/v	τρυβλία
0,5	3
0,2	3
0	3

Επομένως από ένα διάλυμα 50ml di νερό με 10 gr σακχαρόζης, και για όγκο διαλύματος 54ml, ελήφθησαν οι κάτωθι ποσότητες:

2,7 ml διαλύματος	Ανά τρυβλίο	3 επαναλήψεις
1,35 ml διαλύματος	Ανά τρυβλίο	3 επαναλήψεις

Σύνολο 12 τρυβλία με τον μύκητα, 3 τρυβλία με μεταχείριση με sdi νερό άλλα 3 τρυβλία με μεταχείριση μόνο με το μύκητα και τέλος 6 τρυβλία με προσθήκη σακχαρόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, τα οποία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 22 βαθμούς κελσίου.

2.5 Εφαρμογή των *Verticillium dahliae* και *Trichoderma* sp. σε βασιλικό και μελιτζάνα.

Επτά κωνικές χρησιμοποιήθηκαν, όπου σε κάθε μία από αυτές προστέθηκαν 100 ml PD. Στη συνέχεια και οι 7 κωνικές εμβολιάστηκαν με τον μύκητα *Verticillium dahliae* (εικόνα 2.5.1) προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα μικροσκληρώτια του μύκητα .



Εικόνα 2.5.1. Ο μύκητας *Verticillium dahliae* σε κωνική

Ακολούθως σε 9 κωνικές φιάλες προστέθηκαν 100 ml υγρών αποβλήτων, οι οποίες εμβολιάστηκαν με 100 μl αιωρήματος σπορίων του μύκητα *Trichoderma* sp. και με πυκνότητα σπορίων $3,8 \times 10^7$ σπόρια / ml και ακολούθως προστέθηκε σακχαρόζη σε συγκέντρωση 2,5 % για κάθε μια κωνική. Μία κωνική αποτελούσε το μάρτυρα και στην οποία δεν προστέθηκε σακχαρόζη. Φυτάρια βασιλικού που πάρθηκαν από το θερμοκήπιο του Πανεπιστημίου (εικόνα 2.5.2) καθώς και φυτάρια μελιτζάνας (εικόνα 2.5.3) που αγοράστηκαν από φυτωριακή μονάδα χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό του ριζικού συστήματός τους.



Εικόνα 2.5.2. Φυτάρια βασιλικού που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

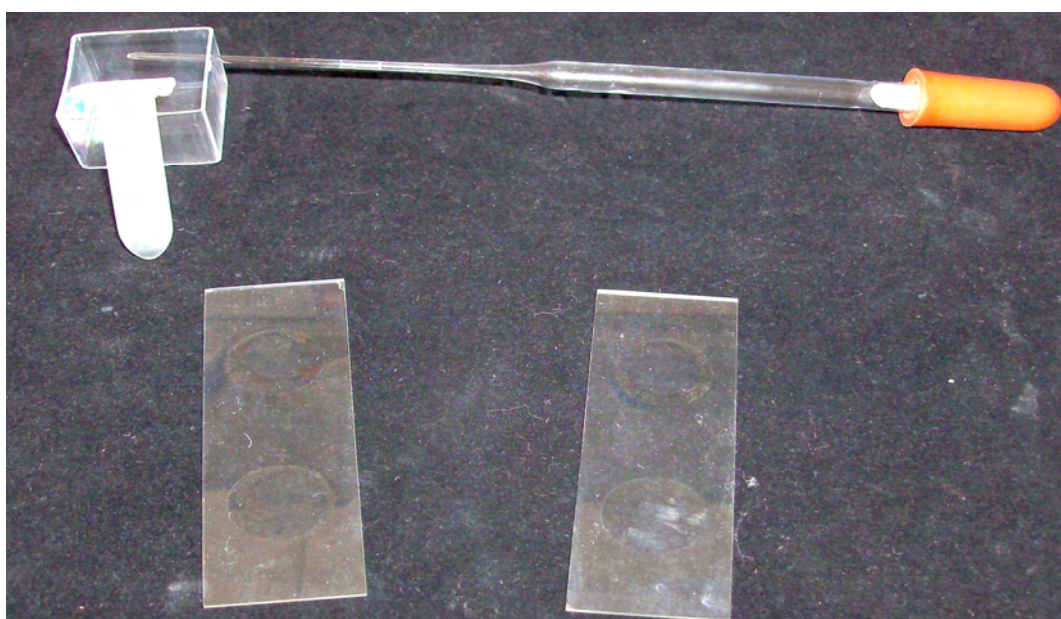


Εικόνα 2.5.3. Φυτάρια μελιτζάνας που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

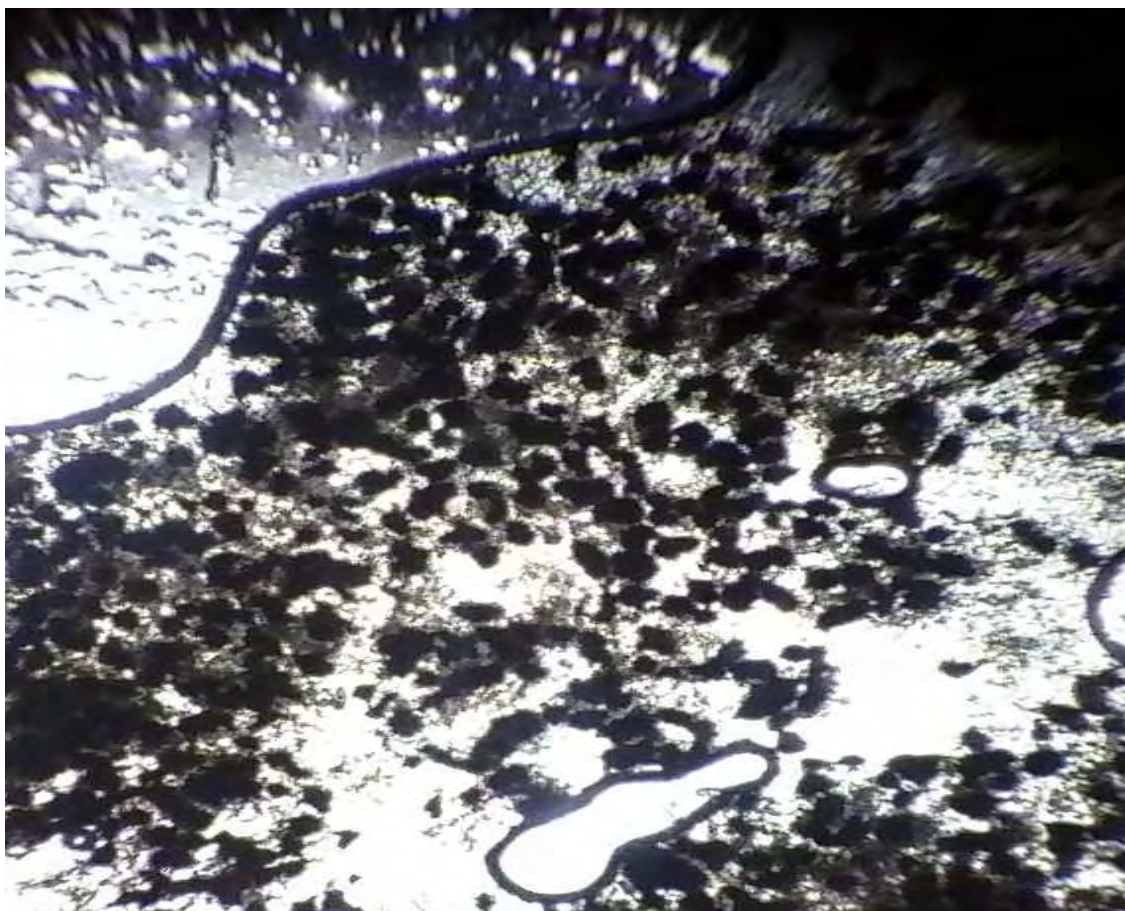
Χρησιμοποιήθηκαν 20 μικροσωληνίσκοι, όπου στους 10 τοποθετήθηκαν φυτάρια βασιλικού και στους άλλους 10 φυτάρια μελιτζάνας, όπου αμφότερα είχαν προστεθεί αρχικά 0,5 ml αποστειρωμένο νερό. Τα μικροσκληρώτια του μύκητα *Verticillium dahliae* ελήφθησαν από σωλήνα με καλλιέργεια του μύκητα σε PDA (εικόνα 2.5.4). Ελήφθησαν τέσσερα μικροσκληρώτια για κάθε φυτάριο (εικόνα 2.5.5-2.5.6-2.5.7).



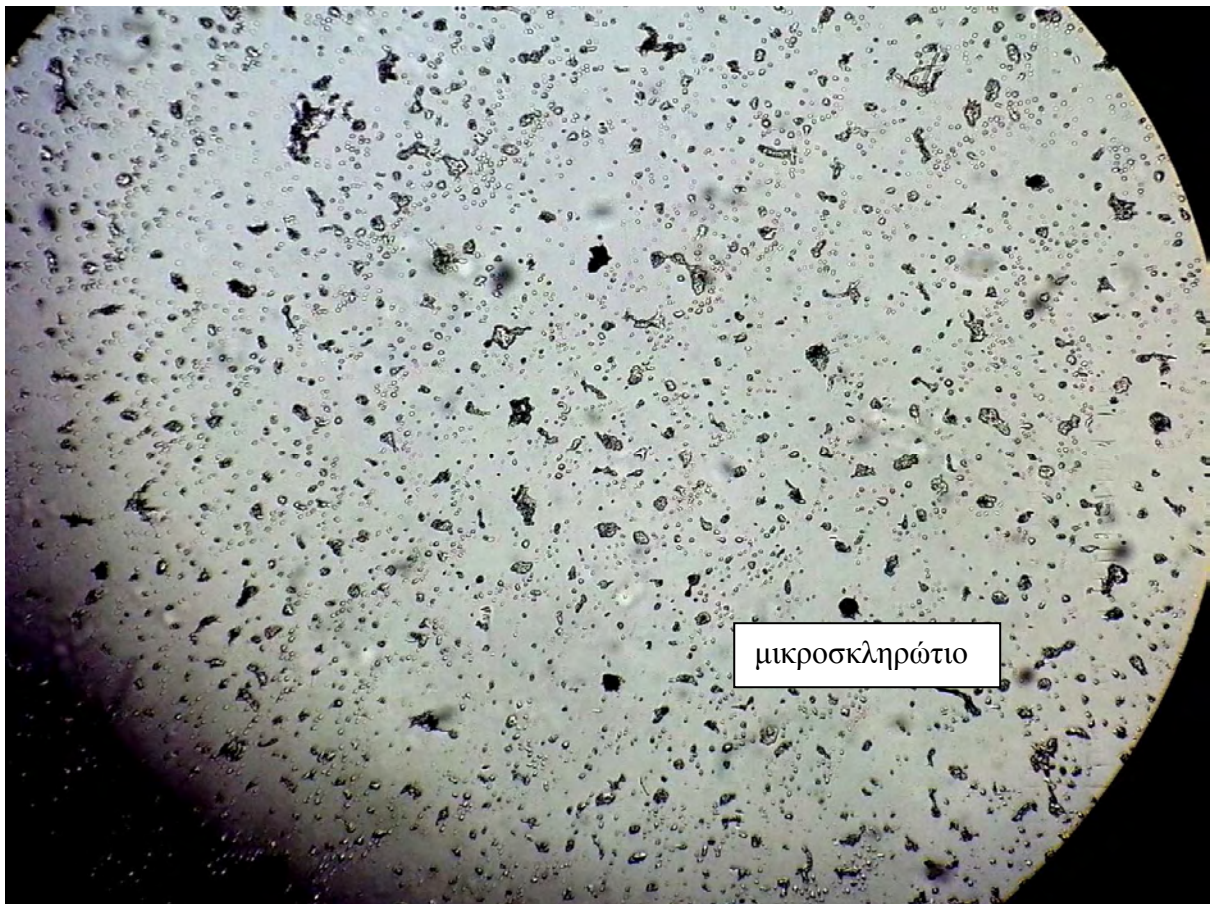
Εικόνα 2.5.4. Ανάπτυξη το μύκητα *Verticillium dahliae* εντός της κωνικής



Εικόνα 2.5.5. Αντικειμενοφόρος cavity slide, πιπέτα και διάλυμα με τα μικροσκληρώτια του μύκητα *Verticillium dahliae*



Εικόνα 2.5.6 Μικροσκληρώτια του μύκητα *Verticillium dahliae*.



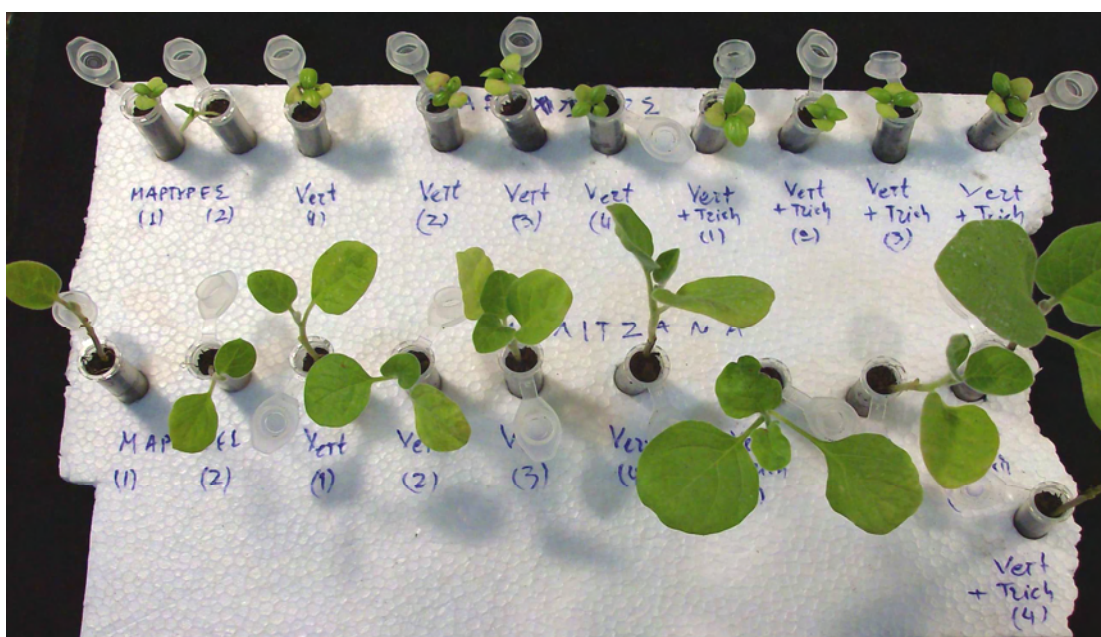
Εικόνα 2.5.7 Μικροσκληρώτια του μύκητα *Verticillium dahliae* (τα μεγάλα μαύρα στίγματα) .

Αφού πρώτα κλαδεύτηκαν τα ριζίδια τους προκειμένου να δημιουργηθούν πληγές στο ριζικό τους σύστημα, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα φυτάρια μέσα στους μικροσωληνίσκους . Προστέθηκε μισό γραμμάριο χώμα και στη συνέχεια ριζοποτίστηκαν με 400 μl υγρή καλλιέργεια *Trichoderma* sp. σε υγρά απόβλητα (εικόνα 2.5.8) .



Εικόνα 2.5.8 *Trichoderma* sp. αναπτυγμένο σε υγρά απόβλητα

Τελικά για κάθε είδος φυτού, υπήρχαν 2 μικροσωληνίσκοι ως μάρτυρες (δηλαδή το φυτό με το χώμα), 4 μικροσωληνίσκοι εμβολιασμένοι με το μύκητα *Verticillium dahliae* και 4 μικροσωληνίσκοι εμβολιασμένοι με τους μύκητες *Verticillium dahliae* και *Trichoderma* sp. (εικόνα 2.5.9) οι οποίοι αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία δωματίου.

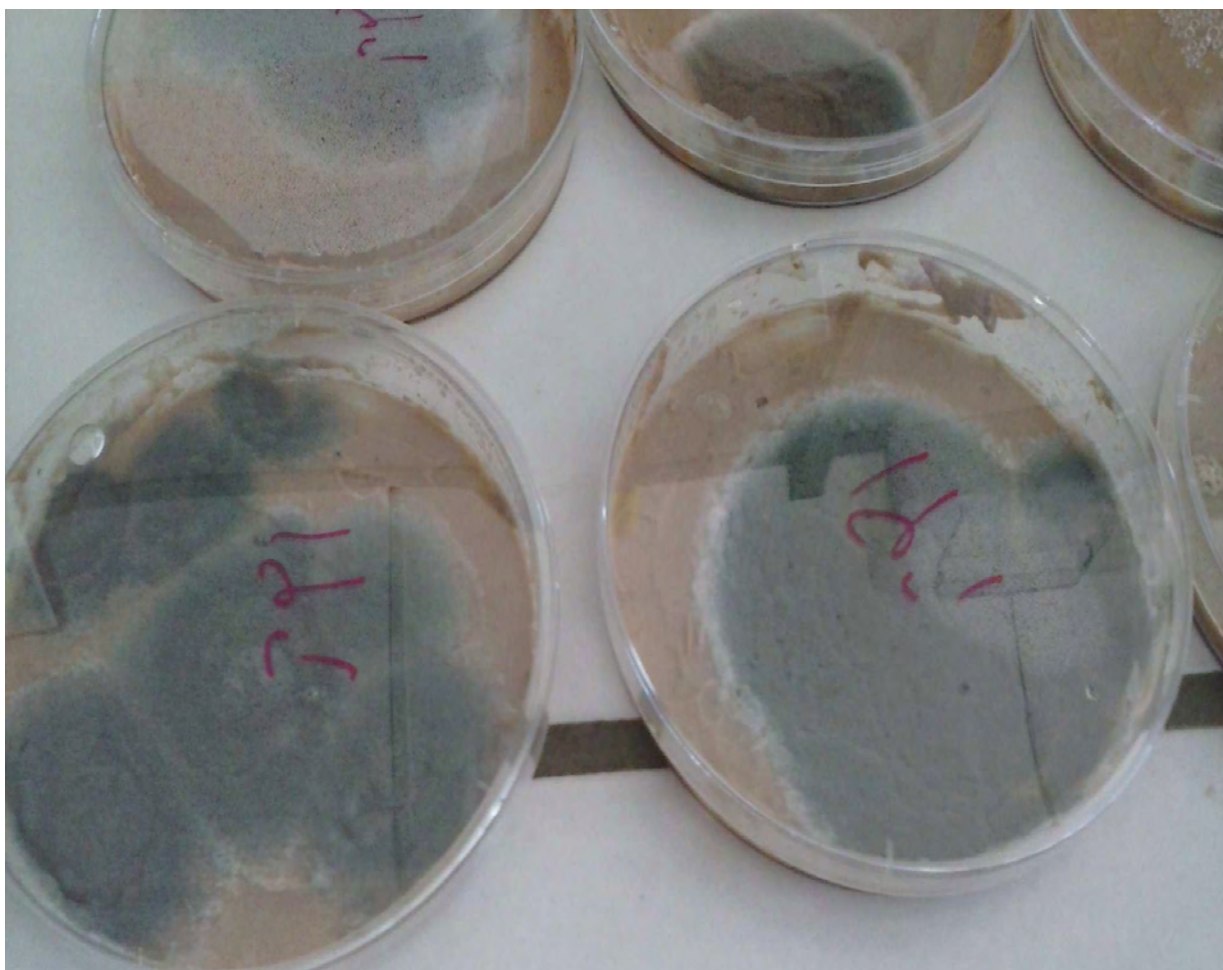


Εικόνα 2.5.9. Βασιλικοί και οι μελιτζάνες σε μικροσωληνίσκους

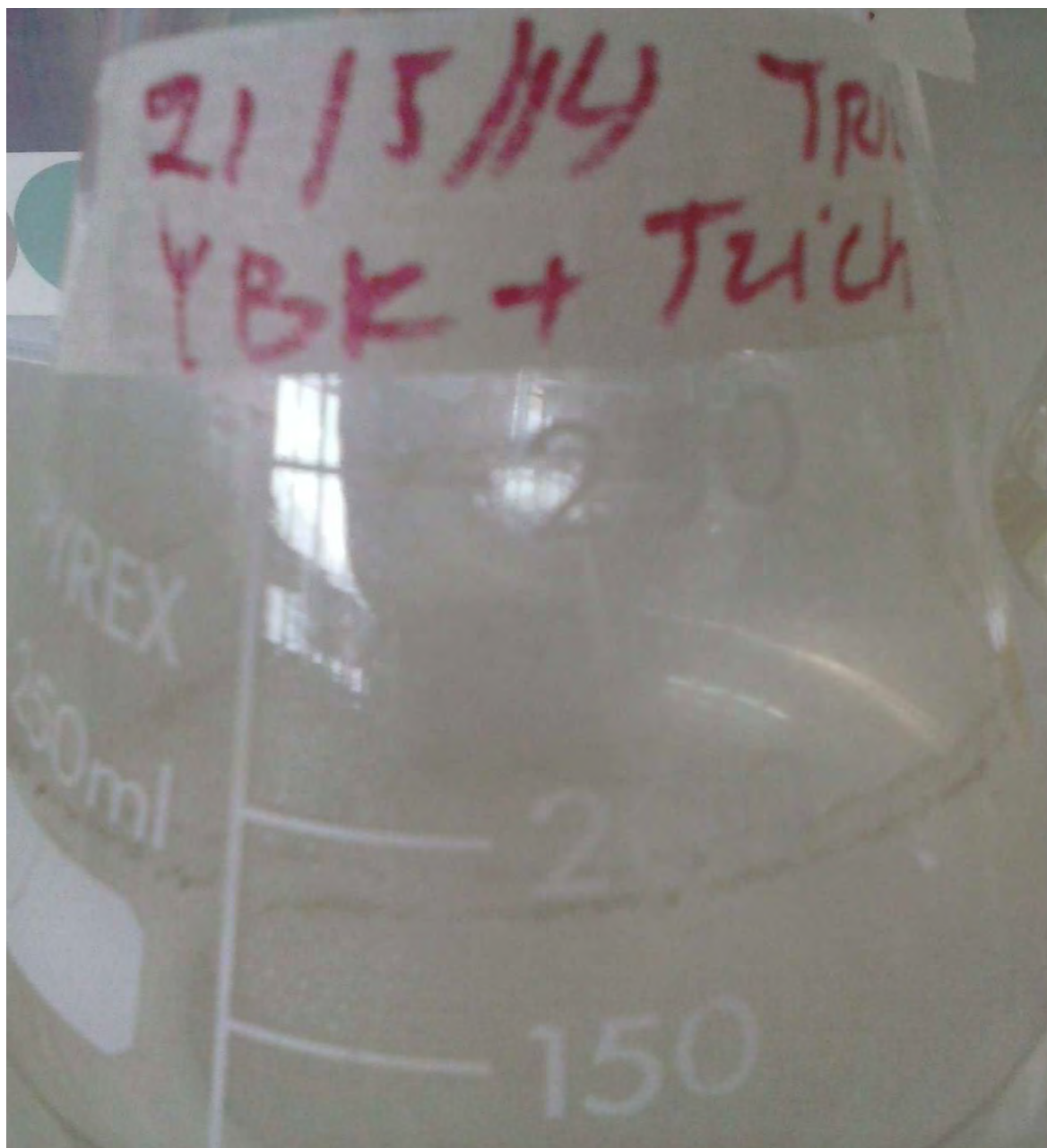
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ιλύ - *Trichoderma* sp. , υγρά απόβλητα- *Trichoderma* sp.

Δεν υπήρξε ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. τόσο στην ιλύ όσο και στο υλικό PDA (εικόνα 3.1.1) αλλά αντί αυτού υπήρχαν επιμολύνσεις με το μύκητα *Penicillium* sp. ενώ και στις κωνικές φιάλες δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη στα υγρά απόβλητα της γαλακτοβιομηχανίας (εικόνα 3.1.2).



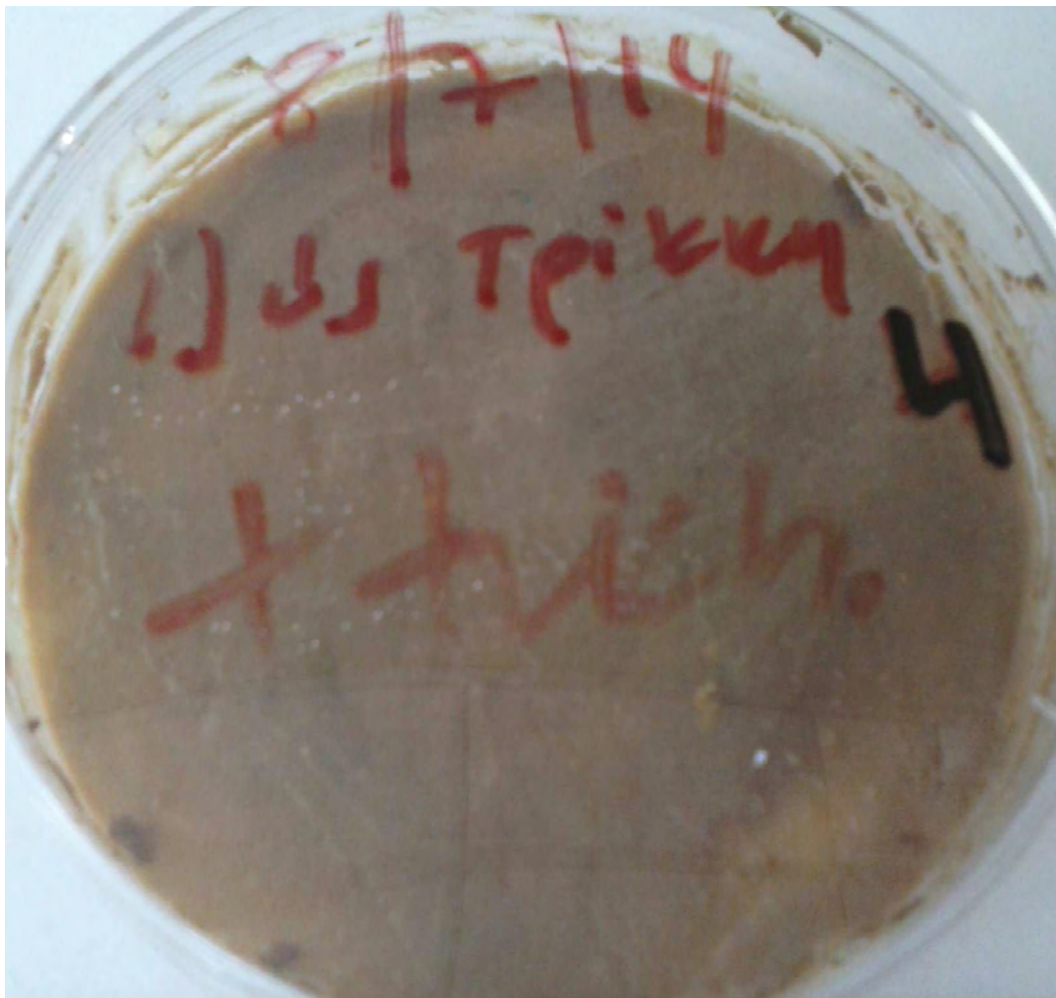
Εικόνα 3.1.1 Ουδεμία ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. στην ιλύ βιολογικού καθαρισμού γαλακτοβιομηχανίας . Αντίθετα βλέπουμε ανάπτυξη *Penicillium* sp.



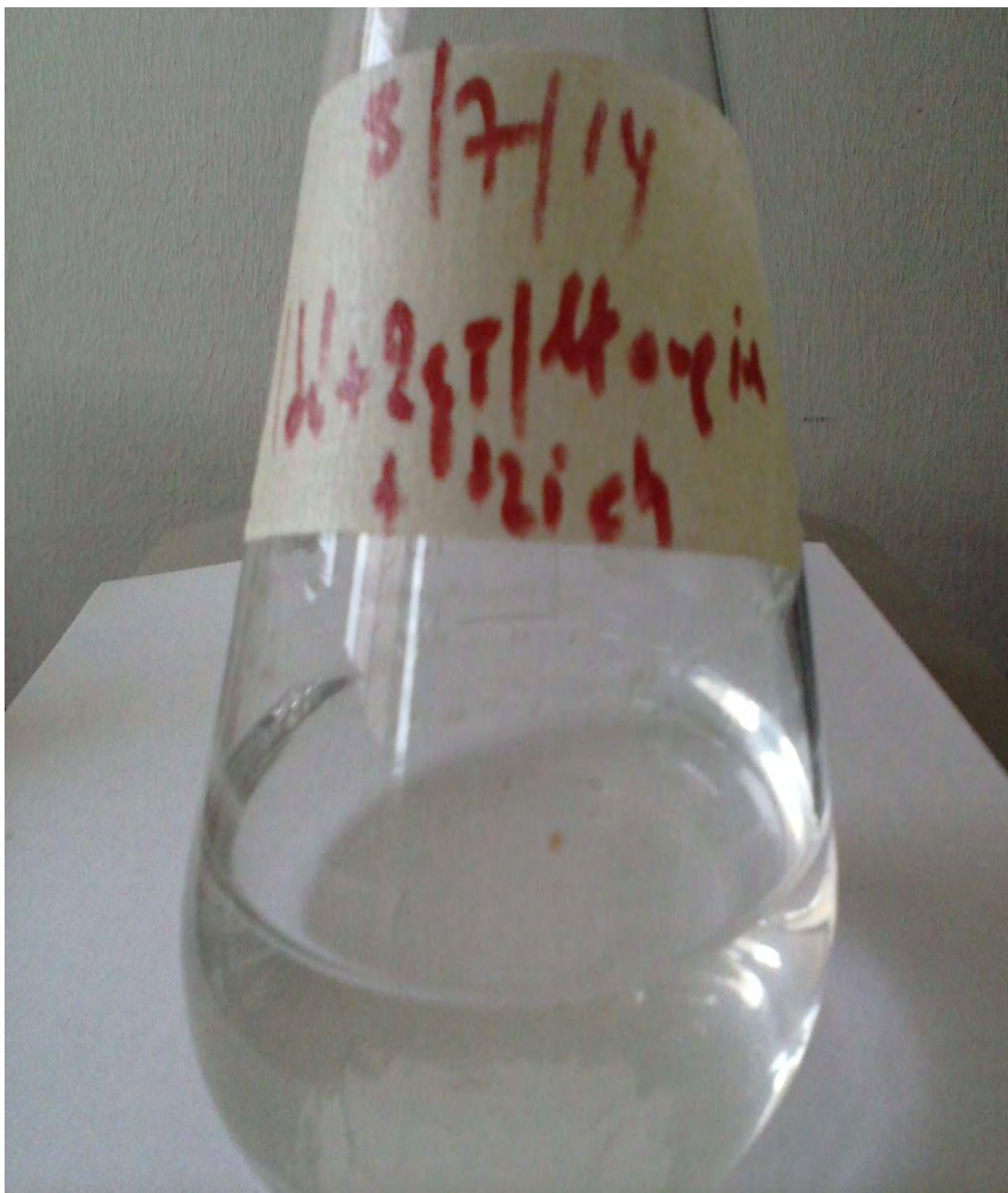
Εικόνα 3.1.2 Μη ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. στα υγρά απόβλητα του βιολογικού καθαρισμού γαλακτοβιομηχανίας

3.2. Ιλύ - ουρία- *Trichoderma* sp., υγρά απόβλητα - ουρία - *Trichoderma* sp.

Δεν υπήρξε ανάπτυξη του μύκητα τόσο στην ιλύ στα τρυβλία όσο και στα υγρά απόβλητα στις κωνικές φιάλες (εικόνα 3.2.1-3.2.2) .



Εικόνα 3.2.1. Μη ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. στην ιλύ βιολογικού καθαρισμού γαλακτοβιομηχανίας μετά προσθήκης ουρίας



Εικόνα 3.2.2. Μη ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. στα υγρά απόβλητα βιολογικού καθαρισμού γαλακτοβιομηχανίας μετά προσθήκης ουρίας

3.3. Ιλύ σακχαρόζη- *Trichoderma* sp., υγρά απόβλητα - ουρία - *Trichoderma* sp.

Δεν υπήρξε ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. στην ιλύ της γαλακτοβιομηχανίας στα τρυβλία (εικόνα 3.3.1) .



Εικόνα 3.3.1 Μη ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. στην ιλύ βιολογικού καθαρισμού γαλακτοβιομηχανίας μετά την προσθήκης σακχαρόζης . Αριστερά είναι ο μάρτυρας και δεξιά το τρυβλίο 5β στο οποίο εμφανίζεται μια πολύ μικρή ανάπτυξη μυκηλίου.

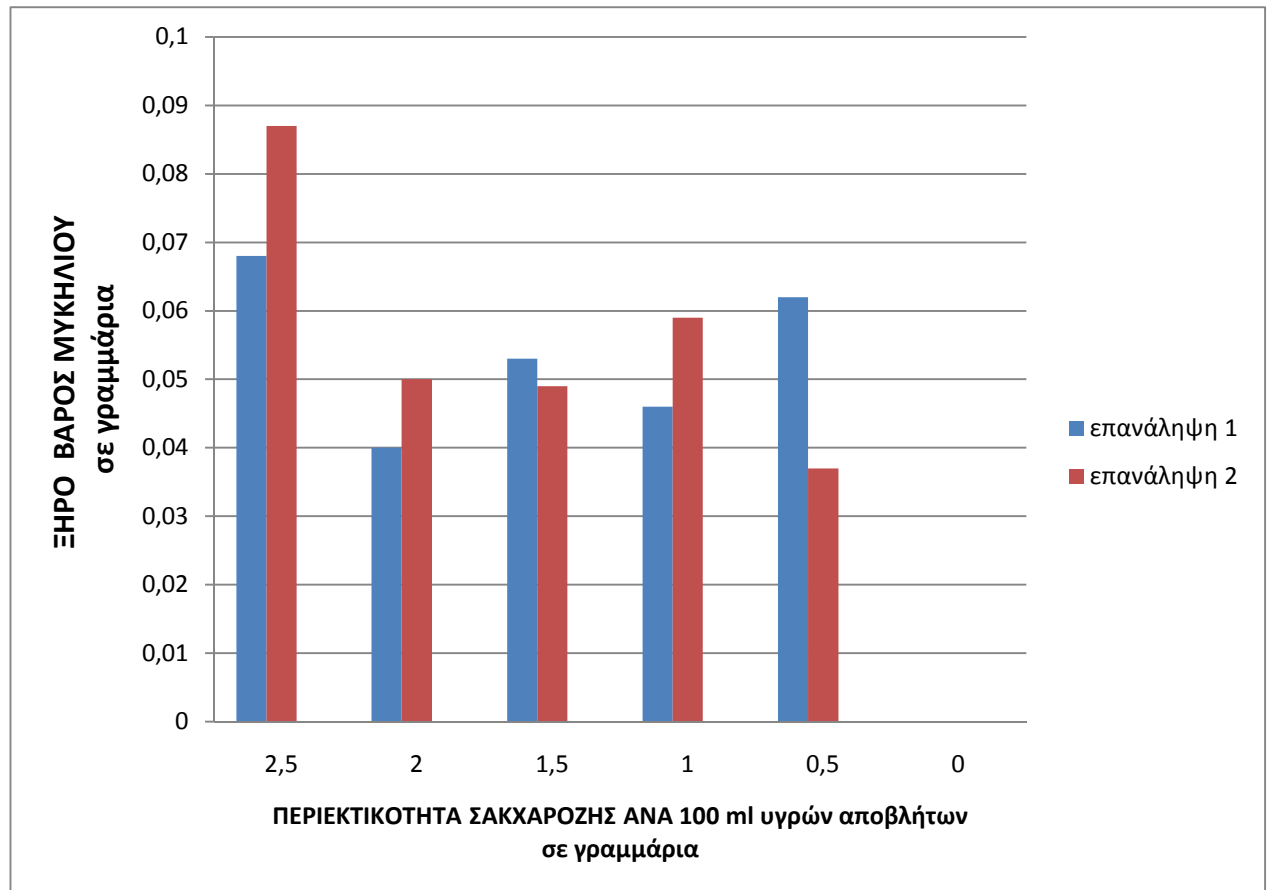
Αντιθέτως στα υγρά απόβλητα υπήρξε ανάπτυξη μυκηλίου όπως φαίνεται στις (εικόνες 3.3.2-3.3.3). Επιπλέον από τις κωνικές ζυγίστηκε το ξηρό βάρος του μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma* sp. αφού προηγουμένως τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 62 βαθμούς κελσίου για 1,5 ώρα .

Οι μετρήσεις του Ξ.Β. του μυκηλίου για κάθε κωνική και για κάθε επανάληψη δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ξηρό βάρος μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma* sp. σε γραμμάρια, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml υγρών αποβλήτων ανά κωνική φιάλη.

ΚΩΝΙΚΗ	Συγκέντρωση σακχαρόζης % β.κ.ο σε υγρά απόβλητα	Ξ.Β. Μυκηλίου σε γραμμάρια
Μάρτυρας 1	0	0
Μάρτυρας 2	0	0
1α	2,5	0,068
1β	2,5	0,087
2α	2	0,04
2β	2	0,05
3α	1,5	0,053
3β	1,5	0,049

4α	1	0,046
4β	1	0,059
5α	0,5	0,062
5β	0,5	0,037

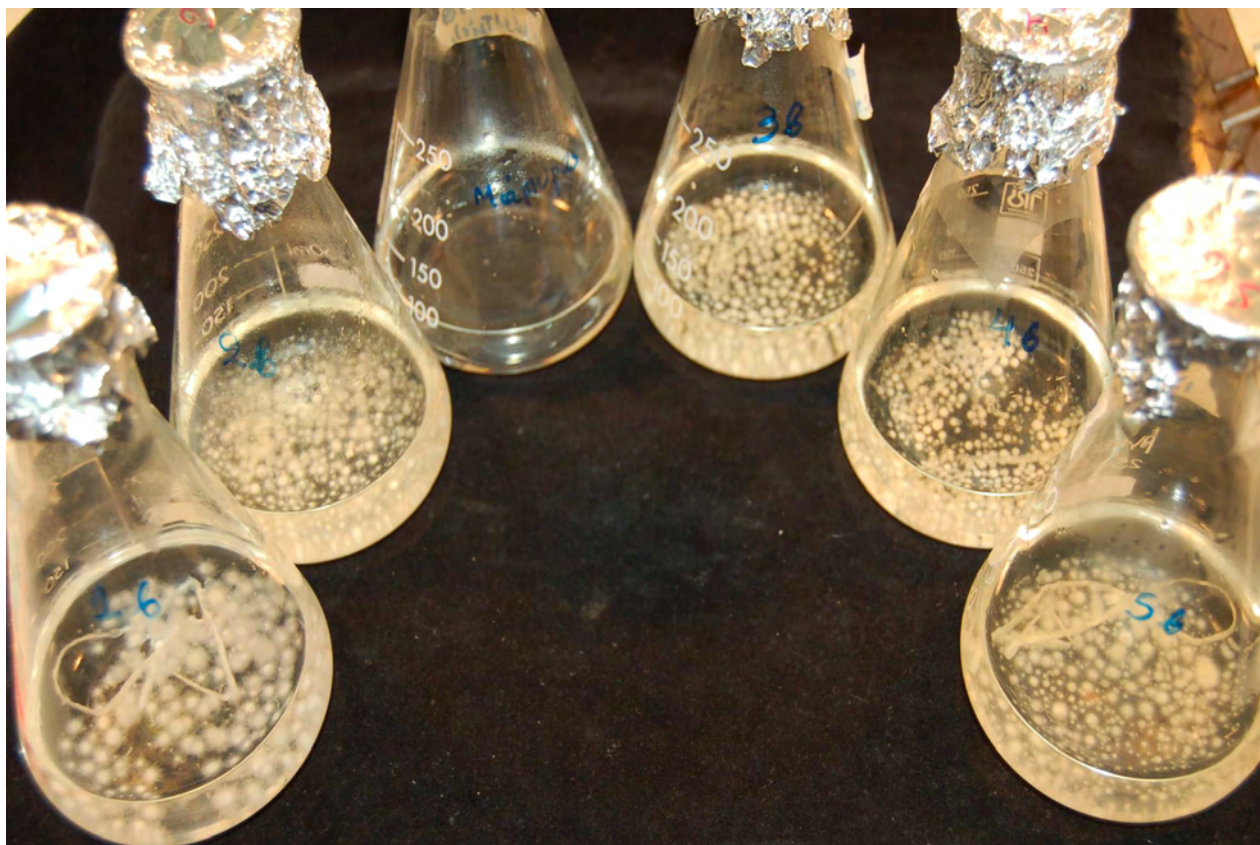


ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1 : Σχηματική απεικόνιση του ξηρού βάρους μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma s.p* σε γραμμάρια, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml υγρών αποβλήτων ανά κωνική φιάλη και με μια πυκνότητα σπορίων του μύκητα $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml

Από τα αποτελέσματα του ανωτέρω πίνακα και από το σχεδιάγραμμα 1 , προκύπτει ότι για την συγκέντρωση σακχαρόζης 2,5 γραμμάρια ανά κωνική στην οποία έχουμε ποσότητα 100 ml υγρών αποβλήτων, έχουμε την υψηλότερη τιμή Ξηρού Βάρους μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma sp.* και με μια πυκνότητα σπορίων $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml με 0,068 γρ. ξηρού βάρους στην πρώτη επανάληψη και με 0,087 γρ. ξηρού βάρους στη δεύτερη επανάληψη, ενώ στις πιο μικρές συγκεντρώσεις σακχαρόζης το ξηρό βάρος παρουσιάζει μικρές αυξομειώσεις



Εικόνα 3.3.2. Ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. στα υγρά απόβλητα βιολογικού καθαρισμού γαλακτοβιομηχανίας μετά την προσθήκης σακχαρόζης . Στο κέντρο της εικόνας φαίνεται ο μάρτυρας και δεξιά και αριστερά του οι διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης στις κωνικές.



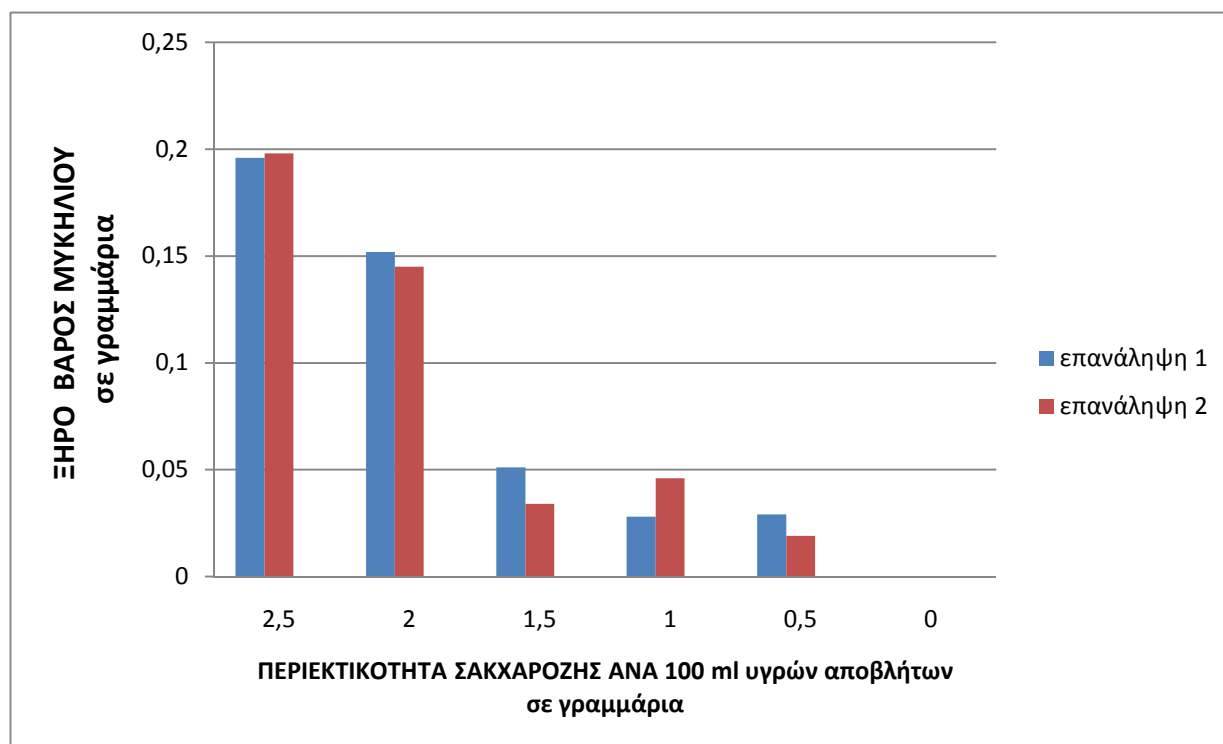
Εικόνα 3.3.3. Ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. στα υγρά απόβλητα βιολογικού καθαρισμού γαλακτοβιομηχανίας μετά την προσθήκης σακχαρόζης. Στο κέντρο της εικόνας φαίνεται ο μάρτυρας και δεξιά και αριστερά του οι διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης στις κωνικές.

Έγιναν δύο επαναλήψεις και οι μετρήσεις του Ξ.Β. του μυκηλίου (εικόνα 3.3.4) για κάθε κωνική και για κάθε επανάληψη δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Ξηρό βάρος μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma* sp. σε γραμμάρια, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml υγρών αποβλήτων ανά κωνική φιάλη.

ΚΩΝΙΚΗ	Περιεκτικότητα σακχαρόζης σε γρ. ανά 100 ml υγρών αποβλήτων	Ξ.Β. Μυκηλίου σε γραμμάρια
Μάρτυρας 1	0	0
Μάρτυρας 2	0	0
1α	2,5	0,196
1β	2,5	0,198
2α	2	0,152
2β	2	0,145
3α	1,5	0,051
3β	1,5	0,034

4α	1	0,028
4β	1	0,046
5α	0,5	0,029
5β	0,5	0,019



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2 : Σχηματική απεικόνιση του ξηρού βάρους μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma s.p* σε γραμμάρια, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml υγρών αποβλήτων σε κωνική φιάλη και με μια πυκνότητα σπορίων $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml

Και από αυτά τα αποτελέσματα του ανωτέρω πίνακα 2 και από το σχεδιάγραμμα 2 , προκύπτει ότι για συγκέντρωση σακχαρόζης 2,5 % ανά κωνική στην οποία είχαμε ποσότητα 100 ml υγρών αποβλήτων , είχαμε την υψηλότερη τιμή Ξηρού Βάρους μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma sp.* και με πυκνότητα σπορίων γύρω στα $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml με 0,196 γρ. ξηρού βάρους στην πρώτη επανάληψη και με 0,198 γρ. ξηρού βάρους στη δεύτερη επανάληψη, ενώ στις πιο μικρές συγκεντρώσεις σακχαρόζης το ξηρό βάρος παρουσίασε μείωση μέχρι του σημείου μηδέν που αντιστοιχεί στο μάρτυρα.



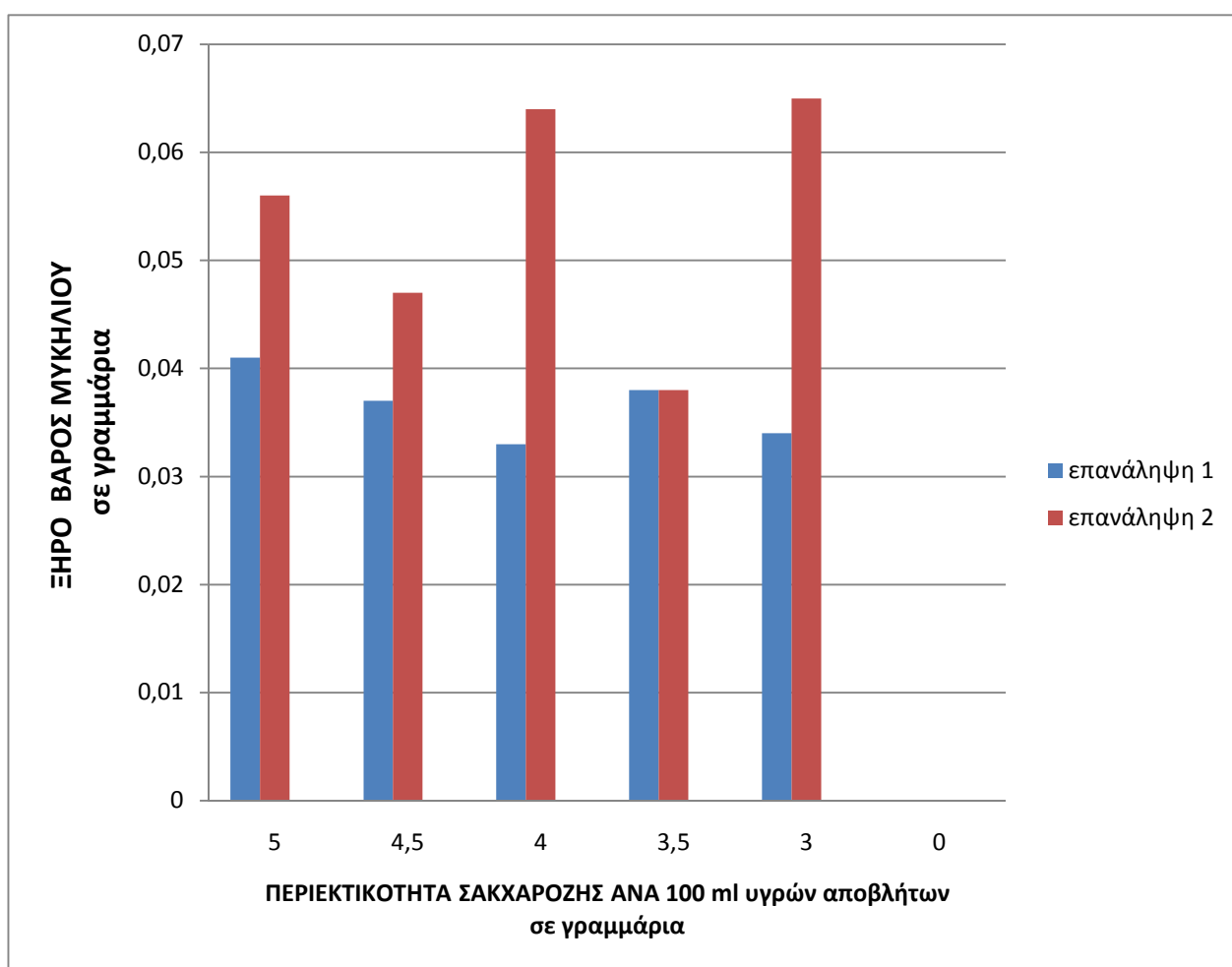
Εικόνα 3.3.4. Μυκήλιο του μύκητα μετά την ξήρανση του σε κλίβανο .

Αλλά και στις 5/5/2015 έγιναν μεταχειρίσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης και αποτελέσματα πάρθηκαν στις 19/5/2015 με τις μετρήσεις του Ξ.Β. του μυκηλίου (εικόνες 3.3.5-3.3.6) για κάθε κωνική και για κάθε επανάληψη να δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Ξηρό βάρος μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma* s.p σε γραμμάρια, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml υγρών αποβλήτων ανά κωνική φιάλη

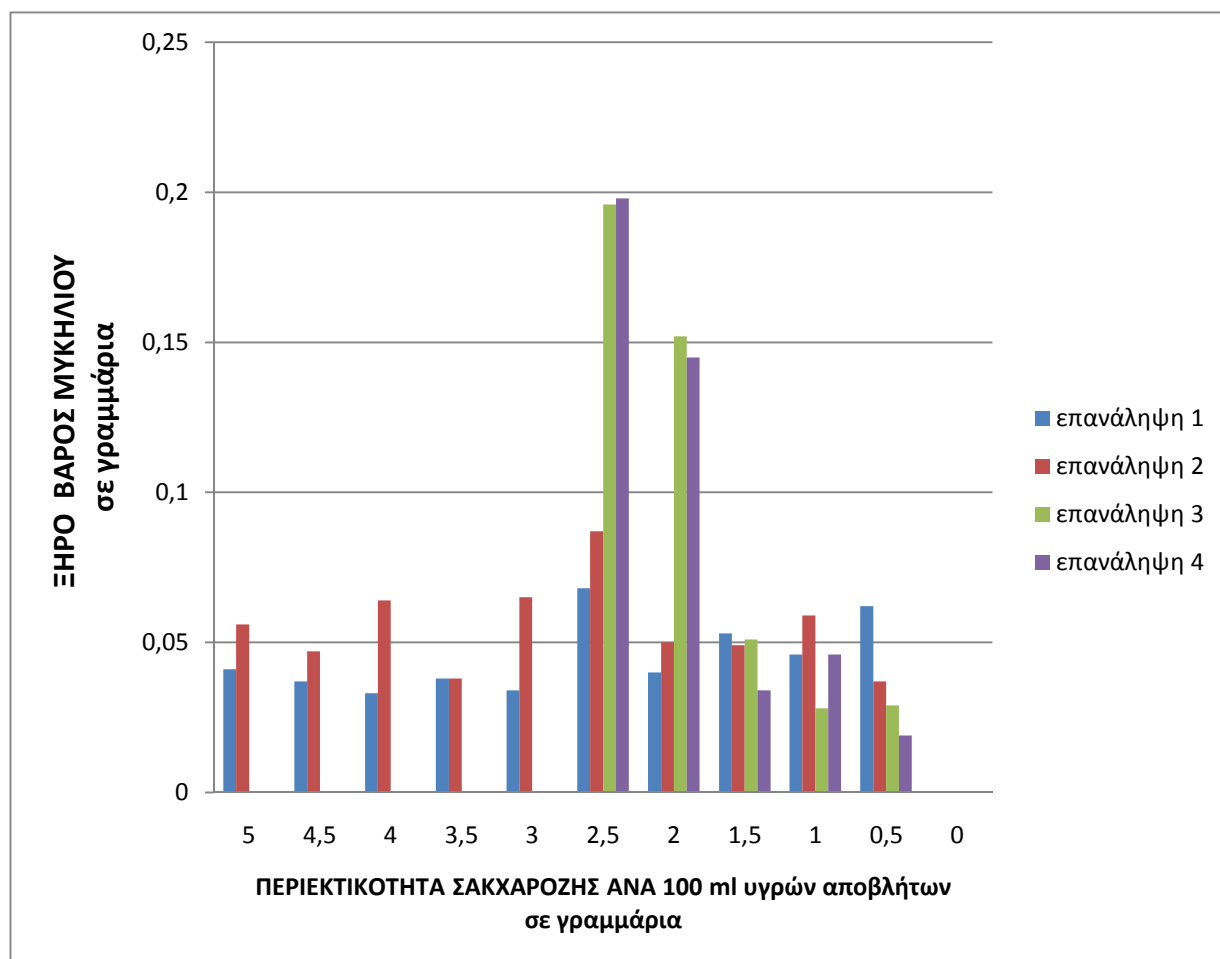
ΚΩΝΙΚΗ	Περιεκτικότητα σακχαρόζης σε γρ. ανά 100 ml υγρών αποβλήτων	Ξ.Β. Μυκηλίου σε γραμμάρια
Μάρτυρας 1	0	0
Μάρτυρας 2	0	0
1α	5	0,041
1β	5	0,056
2α	4,5	0,037
2β	4,5	0,047
3α	4	0,033
3β	4	0,064

4α	3,5	0,038
4β	3,5	0,038
5α	3	0,034
5β	3	0,065



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3 : Σχηματική απεικόνιση του ξηρού βάρους μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma s.p* σε γραμμάρια, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml υγρών αποβλήτων ανά κωνική φιάλη και με πυκνότητα σπορίων $3,6 \times 10^7$ σπόρια / ml

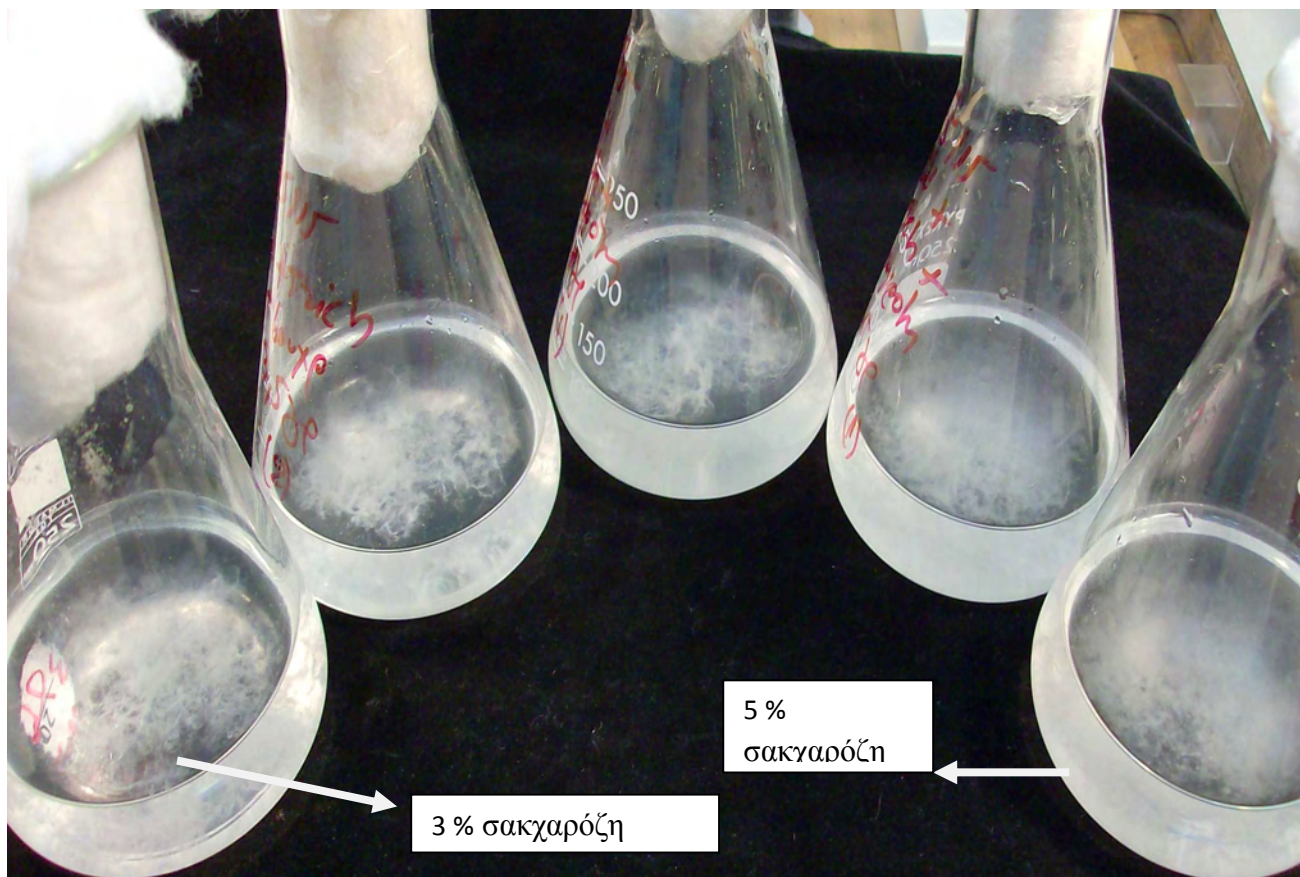
Από τα αποτελέσματα του πίνακα 3 και από το σχεδιάγραμμα 3 , προκύπτει ότι με πυκνότητα σπορίων του μύκητα $3,6 \times 10^7$ σπόρια / ml είχαμε σχεδόν την ίδια ανάπτυξη μυκηλίου παρουσιάζοντας μικρές αυξομειώσεις στο ξηρό βάρος μέχρι του σημείου μηδέν που αντιστοιχεί στο μάρτυρα.



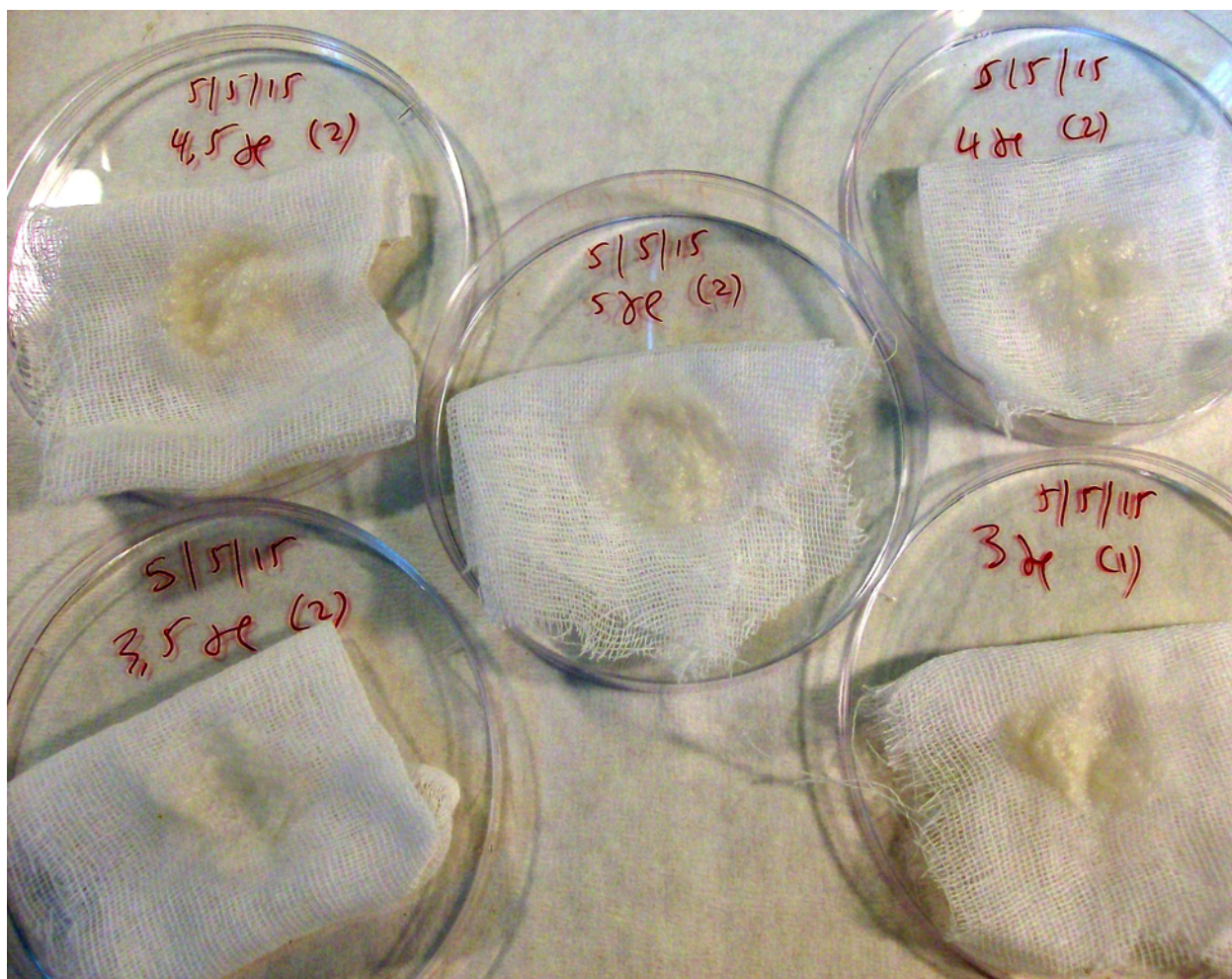
ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4 : Σχηματική απεικόνιση του ξηρού βάρους μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma s.p* σε γραμμάρια, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml υγρών αποβλήτων ανά κωνική φιάλη και για το σύνολο των εφαρμογών με σακχαρόζη και με πυκνότητα σπορίων $3,9 \times 10^7$ σπόρια / ml για συγκεντρώσεις από 3 γρ. μέχρι και 5 γρ σακχαρόζης, ενώ από 0,5γρ. έως και 2,5 γρ είχαμε πυκνότητα σπορίων της τάξης των $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml.

Από το ανωτέρω συγκεντρωτικό σχεδιάγραμμα, στο οποίο παρουσιάζονται όλες οι εφαρμογές που έγιναν στο εργαστήριο και για τις δέκα διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης, φαίνεται πως από την συγκέντρωση των 2% σακχαρόζης και άνω είχαμε ικανοποιητική ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma sp.*. Αυτό ισχύει και για τις συγκεντρώσεις από 3% και άνω λαμβάνοντας υπόψη μας, το γεγονός ότι σε αυτή την εφαρμογή είχαμε το μισό περίπου αιώρημα σπορίων του μύκητα στις κωνικές. Επομένως για διπλάσιο αριθμό σπορίων είχαμε διπλάσιο ξηρό βάρος μυκηλίου. Πάντως είναι εμφανές από

το σχεδιάγραμμα 4 ότι στη συγκέντρωση 2,5% σακχαρόζης έχουμε optimum ανάπτυξη μυκηλίου.



Εικόνα 3.3.5 Ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma* s.p με τη χρήση σακχαρόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μέσα στις κωνικές



Εικόνα 3.3.6 Το μυκήλιο λίγο πριν υποβληθεί σε αποξήρανση στον κλίβανο

3.4. Sdi νερό σακχαρόζη - *Trichoderma* sp.

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή που έγινε στις 04/11/2014 πάρθηκαν στις **18/11/2014** δηλαδή μετά από 14 ημέρες για τις κωνικές με περιεκτικότητα σε σακχαρόζη 2,5% και 2 % ανά κωνική και στις 02/12/2014 για εφαρμογή που έγινε 18/11/2014 δηλαδή μετά από 16 ημέρες για τις κωνικές με περιεκτικότητα σε σακχαρόζη 1,5%, 1% και 0,5% ανά κωνική.

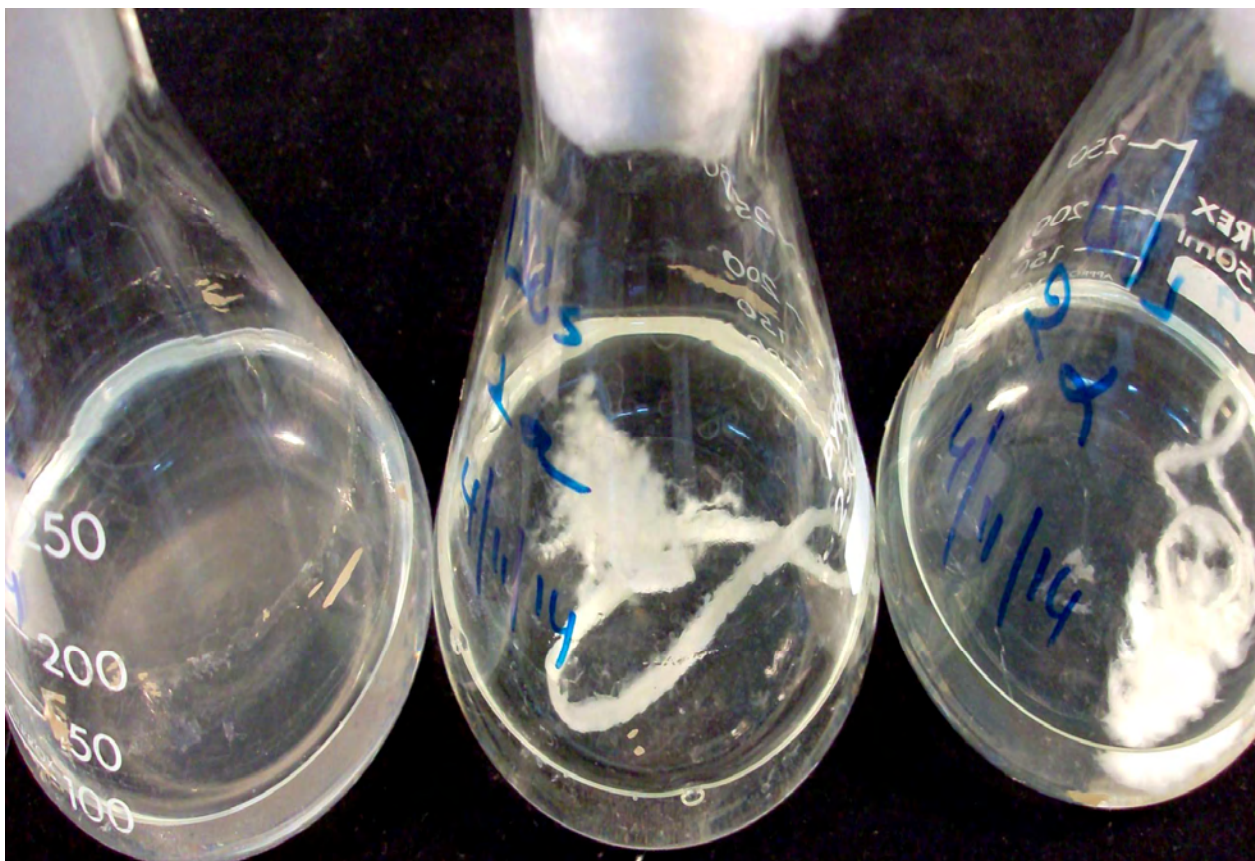
Δεν υπήρξε αξιόλογη ανάπτυξη του μύκητα σε sdi νερό (εικόνες 3.4.1-3.4.2-3.4.3-3.4.4-3.4.5) συγκριτικά με την εφαρμογή σε υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας.



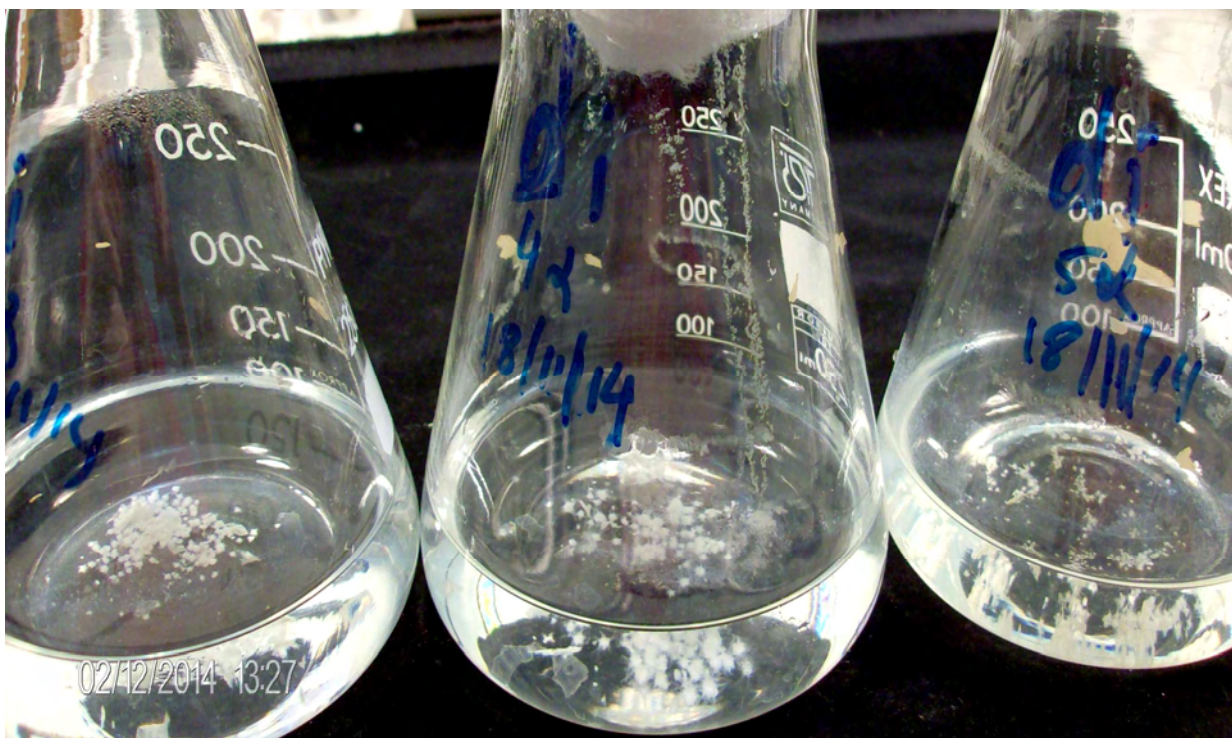
Εικόνα 3.4.1 Αριστερά εφαρμογή σε sdi νερό και δεξιά εφαρμογή σε υγρά απόβλητα. Είναι εμφανή η διαφορά στην ανάπτυξη του μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma s.p* Φωτογραφία από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας στις 11/11/2014.



Εικόνα 3.4.2 Ανάπτυξη σε sdi νερό και αριστερά ο μάρτυρας . Φωτογραφία από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας στις 18/11/2014.



Εικόνα 3.4.3 Ανάπτυξη σε υγρά απόβλητα και αριστερά ο μάρτυρας . Φωτογραφία από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας στις 18/11/2014. Είναι εμφανή η διαφορά στην ανάπτυξη του μύκητα σε σχέση με την ανάπτυξη σε sdi νερό.



Εικόνα 3.4.4 Ανάπτυξη σε sdi νερό για τις κωνικές 3^α-4^α-5^α . Φωτογραφία από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας στις 02/12/2014.



Εικόνα 3.4.5 Ανάπτυξη σε υγρά απόβλητα για τις κωνικές 3^α-4^α-5^α. Φωτογραφία από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας στις 02/12/2014.

Από τις κωνικές ζυγίστηκε το ξηρό βάρος του μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma* sp. αφού προηγουμένως τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 62 βαθμούς κελσίου για 1,5 ώρα (εικόνα 3.4.6.-3.4.7) .



Εικόνα 3.4.6 Μυκήλιο του μύκητα μετά την ξήρανση του σε κλίβανο . Φωτογραφία από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας στις 18/11/2014.



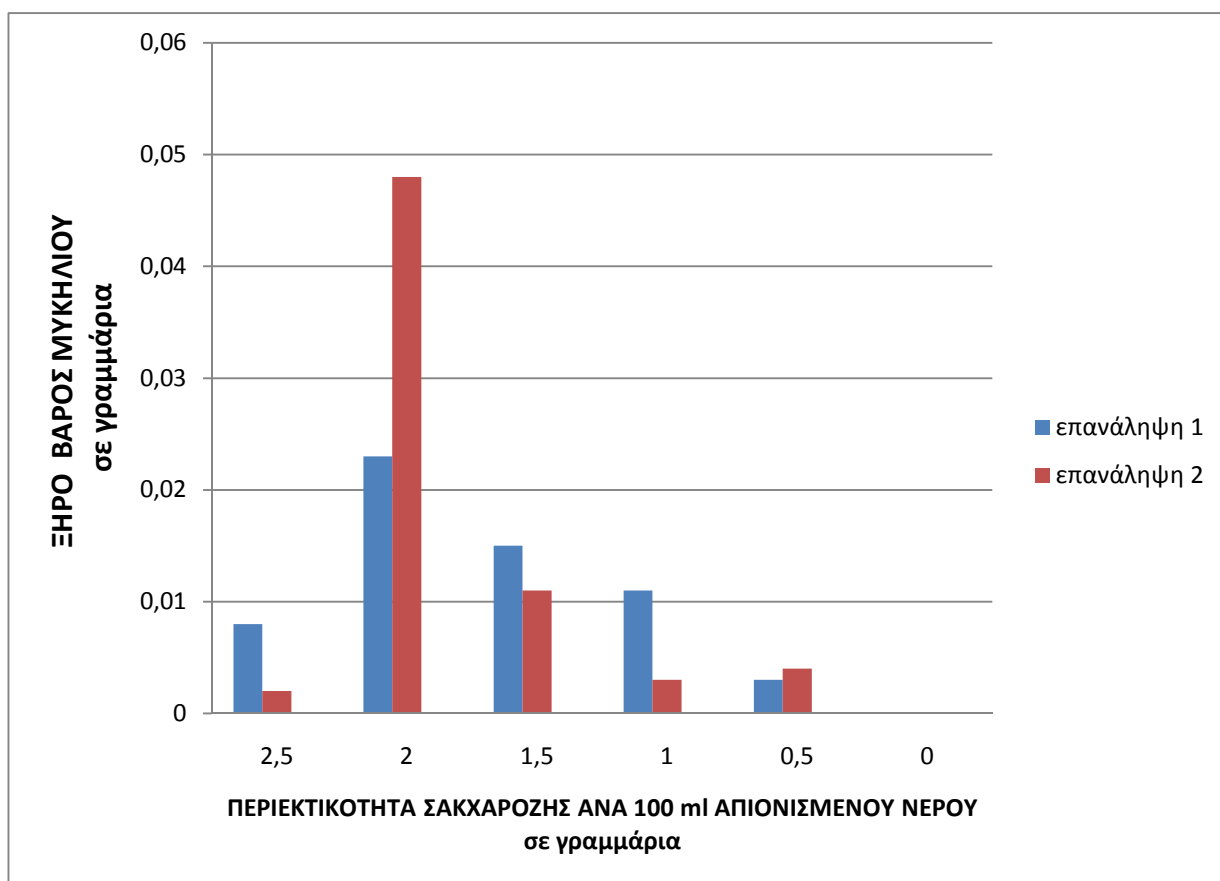
Εικόνα 3.4.7 Μυκήλιο του μύκητα μετά την ξήρανση του σε κλίβανο . Φωτογραφία από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας στις 02/12/2014.

Οι μετρήσεις του Ξ.Β. του μυκηλίου για κάθε κωνική και για κάθε επανάληψη δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Ξηρό βάρος μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma* s.p σε γραμμάρια, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml αποιονισμένου νερού σε κωνική φιάλη.

ΚΩΝΙΚΗ	Περιεκτικότητα σακχαρόζης σε γρ. ανά 100 ml sdi νερό	Ξ.Β. Μυκηλίου σε γραμμάρια
Μάρτυρας 1	0	0
Μάρτυρας 2	0	0
di 1α	2,5	0,008
di 1β	2,5	0,002
di 2α	2	0,023
di 2β	2	0,048
di 3α	1,5	0,015
di 3β	1,5	0,011
di 4α	1	0,011

di 4β	1	0,003
di 5α	0,5	0,003
di 5β	0,5	0,004



ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5 : Σχηματική απεικόνιση του ξηρού βάρους μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma s.p* σε γραμμάρια, σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml απιονισμένου νερού σε κωνική φιάλη και με πυκνότητα σπορίων $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml

Από τα αποτελέσματα του ανωτέρω πίνακα προκύπτει ότι για οποιαδήποτε συγκέντρωση σακχαρόζης ανά κωνική και με πυκνότητα σπορίων $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml στην οποία είχαμε ποσότητα 100 ml di νερού, το ξηρό βάρος του μυκηλίου ήταν σε πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα σε αντίθεση με την χρήση υγρών αποβλήτων. Sdi νερό και σακχαρόζη 2%, έχουμε optimum ανάπτυξη περίπου 4 φορές μικρότερη σε σχέση με τα υγρά απόβλητα.

3.5. Υγρά απόβλητα - ωφέλιμοι μικροοργανισμοί

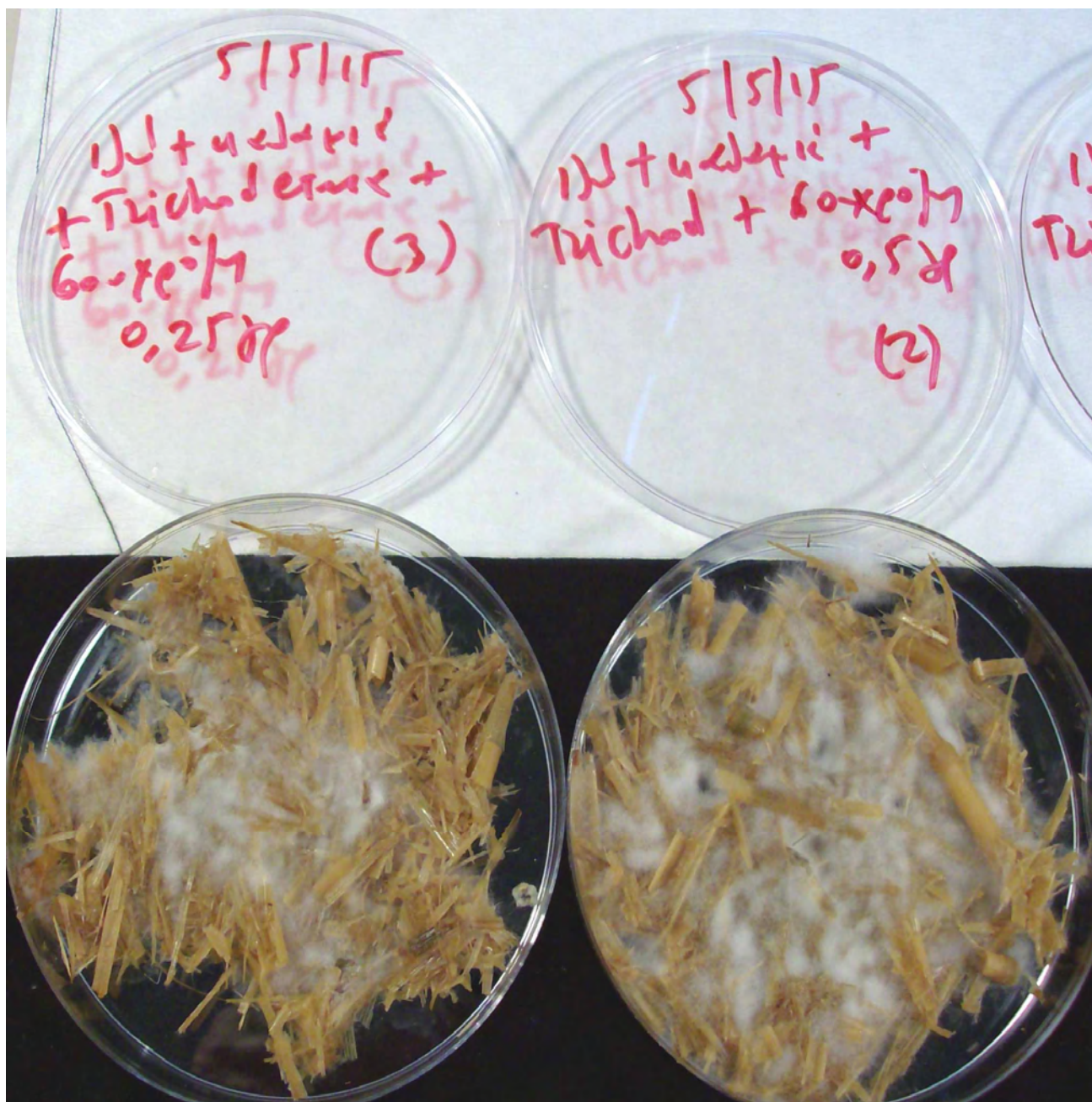
Δεν υπήρξε ανάπτυξη ωφέλιμων μικροοργανισμών στις κωνικές με χρήση ως πρώτη ύλη των υγρών αποβλήτων (εικόνα 3.5.1).



Εικόνα 3.5.1 Μηδενική ανάπτυξη μυκήλιου από το σκεύασμα MICOSAT-F στις κωνικές

3.6. Υγρά απόβλητα (Υ) καλαμιά (Κ) σακχαρόζη (Σ) - *Trichoderma* sp. (Τ)

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή που έγινε στις 05/05/2015 πάρθηκαν στις 12/05/2015 δηλαδή μετά από 7 ημέρες. Στα τρυβλία που είχαμε υγρά απόβλητα και που είχε γίνει προσθήκη σακχαρόζης, εμφανίζουν λευκό μυκήλιο. Το μυκήλιο στην περίπτωση της προσθήκης 0,5 γρ. σακχαρόζης / τρυβλίο (5%) υπερτερεί σε ανάπτυξη έναντι του άλλου με προσθήκη 0,25 γρ. σακχαρόζης (μισή ποσότητα) / τρυβλίου (2,5%) (εικόνα 3.6.1). Η ταυτοποίηση της παρουσίας του μύκητα *Trichoderma* sp. έγινε με την δημιουργία παρασκευάσματος από το λευκό μυκήλιο (εικόνα 3.6.2).

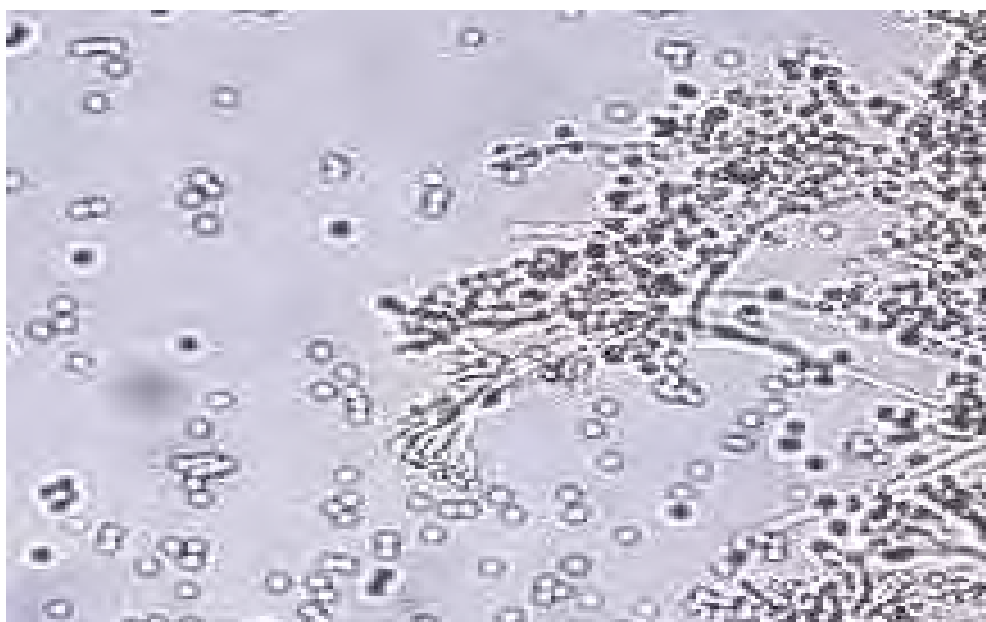


Εικόνα 3.6.1 Τρυβλία στα οποία έχουμε ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma s.p.* Αριστερά με προσθήκη 0,25 γρ. σακχαρόζης και δεξιά με 0,5 γρ σακχαρόζης. Είναι προφανής η πλουσιότερη ανάπτυξη του μυκηλίου στη δεύτερη περίπτωση

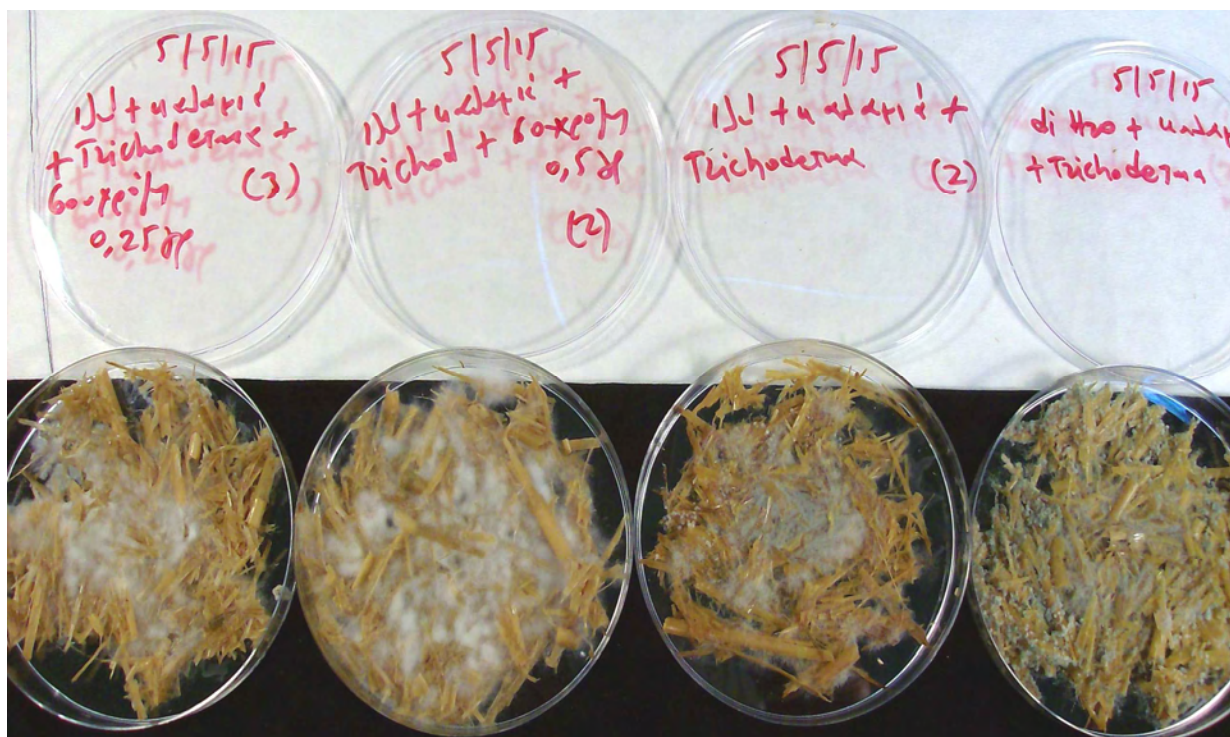


Εικόνα 3.6.2 Παρασκεύασμα στο εργαστήριο από το λευκό μυκήλιο που αναπτύχθηκε στα τρυβλία. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας *Trichoderma* s.p.

Αντίθετα στα υπόλοιπα τρυβλία που είτε δεν υπήρχε προσθήκη σακχαρόζης είτε υπήρχε μεταχείριση με *sdi* νερό, εμφανίστηκαν επιμολύνσεις με άλλα παθογόνα (*Penicillium* sp.) (εικόνα 3.6.3- 3.6.4-3.6.5-3.6.6.).



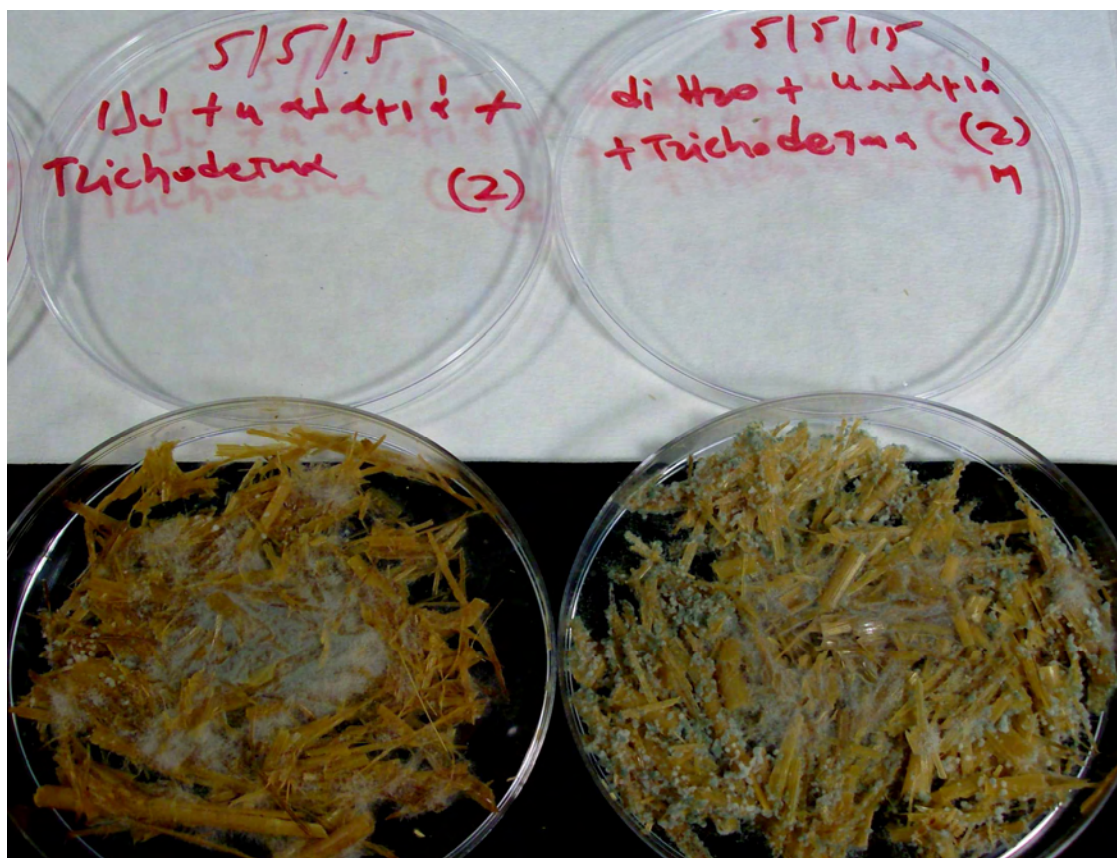
Εικόνα 3.6.3. Παρασκεύασμα στο εργαστήριο από το μυκήλιο που αναπτύχθηκε στα τρυβλία με *di* νερό και από το τρυβλίο χωρίς προσθήκη γλυκαντικής ουσίας. Ταυτοποιήθηκε ο μύκητας *Penicillium* sp..



Εικόνα 3.6.4 Όλα τα τρυβλία με μεταχείριση καλαμιάς . Στα δύο τελευταία δεξιά τρυβλία διακρίνονται οι επιμολύνσεις σε αντίθεση με τα πρώτα δύο τρυβλία όπου διακρίνονται τα μυκήλια του μύκητα *Trichoderma* s.p.



Εικόνα 3.6.5 Διακρίνονται οι επιμολύνσεις του μύκητα *Penicillium* sp..



Εικόνα 3.6.6 Διακρίνονται οι επιμολύνσεις του μύκητα *Penicillium* sp..

3.7. *Verticillium dahliae* και *Trichoderma* sp. σε βασιλικό και μελιτζάνα

Είχαμε ξήρανση όλων των φυταρίων οπότε υπήρξε αδυναμία εξαγωγής συμπεράσματος (εικόνα 3.7.1).



Εικόνα 3.7.1 Τα φυτά του πειράματος ξεραμένα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συζήτηση-Συμπεράσματα

Το παθογόνο *Verticillium dahliae* αποτελεί παγκοσμίως ένα από τα πλέον δύσκολα παθογόνα εδάφους, όπου μπορεί να προκαλέσει τεράστιες ζημιές σε μεγάλο εύρος οικονομικά σημαντικών καλλιεργειών. Γνωρίζοντας ότι αποτελεσματική αντιμετώπισή του δεν υπάρχει με χημικά μέσα, αλλά αντιθέτως τα μέτρα που προτείνονται είναι κυρίως καλλιεργητικά-προληπτικά για την εισαγωγή του παθογόνου σε μια καλλιέργεια αλλά και για τη διάδοσή του εντός αυτής, καταλαβαίνουμε την αξία που έχουν οι βιολογικοί παράγοντες στην καταπολέμησή του.

Υπάρχουν πολλοί ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι δρουν αποτελεσματικά έναντι του εδαφοπαθογόνου *Verticillium dahliae* και οι περισσότεροι από τους οποίους ανήκουν στους μύκητες, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trichoderma* (Dutta, 1981; Ghaffer *et al*, 1988; Henni, 1988; Keinath *et al*, 1991). Ο βιολογικός έλεγχος του παθογόνου *Verticillium dahliae* έχει διερευνηθεί παγκοσμίως και σε πολλές χώρες, αποδεικνύοντας πράγματι την επίδραση που έχουν οι βιοπαθογόνοι μικροοργανισμοί στο εδαφογενή παθογόνο.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά (καθώς από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν προέκυψε κάτι παρόμοιο), κατά πόσο μπορούν τα υγρά απόβλητα από βιολογικό καθαρισμό γαλακτοβιομηχανίας, να αποτελέσουν υπόστρωμα ανάπτυξης του ανταγωνιστή μύκητα *Trichoderma* sp.. Πέρα από τα υγρά απόβλητα ως πρώτη ύλη στο πείραμα, συνδυαστικά χρησιμοποιήθηκαν και τα εξής υλικά: ουρία (46-0-0), σακχαρόζη ($C_{12}H_{22}O_{11}$), σκόνη από σκεύασμα ωφέλιμων μικροοργανισμών (MYCOSAT-F) και τέλος καλαμιά σιταριού.

Η ανάλυση στα χαρακτηριστικά που έχει η ιλύς από εργοστάσιο γαλακτοβιομηχανίας δίνεται στον πίνακα 5 που ακολουθεί (Gratelly *et al.*, 1996):

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Κύρια χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων βιολογικού καθαρισμού γαλακτοβιομηχανίας

	Dairy sludge
Moisture %	86
pH	8.2
EC dS/m	0.42
TOC g kg ⁻¹	339
TKN g kg ⁻¹	75
C/N	4.5
P g kg ⁻¹	8.1
K g kg ⁻¹	3
Ca g kg ⁻¹	87
Mg g kg ⁻¹	4.3
Na g kg ⁻¹	5.8
Fe g kg ⁻¹	2.6
Mn mg kg ⁻¹	25
Cu mg kg ⁻¹	193
Zn mg kg ⁻¹	558
Ni mg kg ⁻¹	25

Από τον ανωτέρω πίνακα φαίνεται πως τα επίπεδα των στοιχείων Mn, Ca, Cu, Zn, Ni υπερέχουν κατά πολύ έναντι των στοιχείων Fe, Na, Mg, K, P, C, N.

Αρχικά μετά από την σημειακή εναπόθεση του ανταγωνιστή μύκητα *Trichoderma* sp. στα τρυβλία και στις κωνικές φιάλες, στα οποία υπήρχαν υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας, φάνηκε πως ο μύκητας δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί, αλλά αντί αυτού υπήρξαν επιμολύνσεις με τον μύκητα *Penicillium* sp. .

Στη συνέχεια μετά από την σημειακή εναπόθεση του ανταγωνιστή μύκητα *Trichoderma* sp. σε τρυβλία και κωνικές, στα οποία υπήρχαν υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας σε συνδυασμό με ουρία (46-0-0) , ο μύκητας δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί παρόλο που υπήρχε μια καλή πηγή αζώτου. Ενδεχομένως να υπήρξε και κάποια μεταχείριση από την γαλακτοβιομηχανία που να εμπόδιζε την ανάπτυξη του μύκητα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα που πήραμε από την προσθήκη σακχαρόζης, ως γλυκαντική ουσία μέσα στις κωνικές φιάλες, στις οποίες υπήρχαν υγρά απόβλητα βιολογικού καθαρισμού γαλακτοβιομηχανίας, φάνηκε ότι για μια συγκέντρωση σακχαρόζης από 2% και πάνω, υπήρξε πολύ καλή ανάπτυξη μυκηλίου. Αναλυτικότερα, από το σχεδιάγραμμα 4 στο οποίο δίνεται η σχηματική απεικόνιση του ξηρού βάρους του μυκηλίου του μύκητα *Trichoderma*

sp. σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα σακχαρόζης που προστέθηκε σε 100 ml υγρών αποβλήτων και για το σύνολο των εφαρμογών που έγιναν, διαπιστώθηκε πως με πυκνότητα σπορίων της τάξης των $3,9 \times 10^7$ σπόρια / ml και για συγκεντρώσεις από 3 % μέχρι και 5% σακχαρόζης υπήρχε πολύ καλή ανάπτυξη του μύκητα, αλλά και για συγκεντρώσεις από 2% έως και 2,5% και με πυκνότητα σπορίων διπλάσια της προηγούμενης, δηλαδή της τάξης των $7,9 \times 10^7$ σπόρια / ml, η ανάπτυξη του *Trichoderma* sp. ήταν άριστη (ξηρό βάρος της τάξεως των 0,2 γρ). Υγρά απόβλητα και συγκέντρωση σακχαρόζης 2,5% είχαμε optimum ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp..

Τα αποτελέσματα που πήραμε για τη χρήση της ιλύος, έδειξαν ότι αυτή δεν έδωσε αποτελέσματα για την ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp. και ως εκ τούτου, η περαιτέρω μεταχείριση με αυτή εγκαταλείφθηκε.

Επιπλέον στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης δηλαδή από 0,5% έως και 1,5% δεν υπήρξε καλή ανάπτυξη του μύκητα, με το ξηρό βάρος αυτού να είναι της τάξεως των 0,05 γρ. Όσον αφορά το μάρτυρα φάνηκε πως χωρίς προσθήκη σακχάρου δεν έχω σημαντική ανάπτυξη.

Λαμβάνοντας υπόψη μας τα ανωτέρω αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι η σακχαρόζη ($C_{12}H_{22}O_{11}$), λειτούργησε ως πηγή ενέργειας για το μύκητα *Trichoderma* sp. και ωφέλησε την ανάπτυξή του μέσα σε ένα διάστημα δώδεκα ημερών, χρησιμοποιώντας παράλληλα ως πρώτη ύλη τα υγρά απόβλητα της γαλακτοβιομηχανίας.

Αντίθετα όταν έγινε προσθήκη σακχαρόζης μέσα στις κωνικές φιάλες, στις οποίες όμως υπήρχε αντί για υγρά απόβλητα απιονισμένο νερό (sdi νερό), και λαμβάνοντας υπόψη το σχεδιάγραμμα 5, φάνηκε ότι για την συγκέντρωση σακχαρόζης 2 % είχαμε ξηρό βάρος μυκηλίου 0,05 γρ, ενώ για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις το ξηρό βάρος του μυκηλίου ήταν σχεδόν μηδενικό (0,01 γρ). Sdi νερό και συγκέντρωση σακχαρόζης 2%, είχαμε optimum ανάπτυξη του μύκητα *Trichoderma* sp., περίπου 4 φορές μικρότερη από τα υγρά απόβλητα. Επομένως από τα ανωτέρω βγαίνει το συμπέρασμα ότι η χρήση απιονισμένου νερού (παρόλο που είχαμε την χρήση της σακχαρόζης), δεν ωφέλησε την καλή ανάπτυξη μυκηλίου για το μύκητα *Trichoderma* sp.. Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα, όταν μέσα στα υγρά απόβλητα εισήχθει ποσότητα σκόνης με ωφέλιμους μικροοργανισμούς από το σκεύασμα MICOSAT-F WP (συμπεριλαμβανόταν ο μύκητας *Trichoderma* sp.). Παρόλο που οι κωνικές διατηρήθηκαν για 35 μέρες προκειμένου να υπάρξει ανάπτυξη μυκηλίου, το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό.

Ακολουθώντας με βάση τα στοιχεία που πήραμε από την παρούσα διατριβή όσον αφορά στη χρήση της καλαμιάς σιταριού ως υπόστρωμα ανάπτυξης του μύκητα μετά από την μεταχείρισή του με υγρά απόβλητα και προσθήκη σακχαρόζης, διαπιστώθηκε πως ο

μύκητας αναπτύσσεται πολύ καλά, δίνοντας ένα πλούσιο λευκό μυκήλιο. Η καλαμιά γνωρίζουμε πως είναι μια πλούσια πηγή αζώτου και καλίου. Η ύπαρξη του σακχάρου και εδώ φαίνεται πως είναι καθοριστική, λειτουργώντας ως πηγή ενέργειας . Η χρήση του συνδυασμού καλαμιά- απιονισμένο νερό σακχαρόζη δεν έδωσε καλά αποτελέσματα.

Γνωρίζοντας ότι τα απόβλητα των βιολογικών καθαρισμών των γαλακτοβιομηχανιών αποτελούν μια πηγή ρύπανσης για το περιβάλλον μέσα στο οποίο ζούμε, αλλά και του ότι για να αφυδατωθούν τα απόβλητα που υπάρχουν στις δεξαμενές , και να προκύψουν τα στερεάς μορφής , θα πρέπει η βιομηχανία να καταναλώσει ενέργεια , (πράγμα που μεταφράζεται σε χρήματα) καταλαβαίνουμε πόσο σημαντικά είναι τα αποτελέσματα από την παρούσα διατριβή.

Τα απόβλητα λοιπόν τα οποία αποτελούν ένα άχρηστο προϊόν για τη βιομηχανία, αντί να αφυδατώνονται και να δίνονται έναντι ενός ευτελούς ποσού στους αγρότες για χρήση ως βελτιωτικό του εδάφους τους , θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή και ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών σε εδαφογενή παθογόνα, όπως αποδείχτηκε στην παρούσα διατριβή για το μύκητα *Trichoderma* sp..

Αλλά και όσο αφορά στην καλαμιά , γνωρίζουμε πως τα υπολείμματα των καλλιεργειών αυτών με σωστή διαχείριση μπορούν να προσφέρουν προστασία στο χωράφι από την διάβρωση και να εμπλουτίσουν το έδαφος με οργανική ουσία. Η εύκολη πρακτική που ακολουθείται κατά κόρον ,του καψίματος της καλαμιάς στερεί το έδαφος από οργανική ουσία, αλλά και από άλλα πλεονεκτήματα. Γνωρίζοντας πως μια μπάλα άχυρου διατίθεται προς ένα ευρώ το πολύ , καταλαβαίνουμε πόσο χρήσιμα είναι τα αποτελέσματα από το πείραμά . Προφανώς με βάση τα δεδομένα που πάρθηκαν , θα μπορούσε ένα άχρηστο προϊόν (όπως είναι και η ιλύς) για τους αγρότες ,όπως είναι η καλαμιά να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη συνδυαστικά με τα απόβλητα από τις γαλακτοβιομηχανίες για την παραγωγή και ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών σε εδαφογενή παθογόνα, όπως αποδείχτηκε στην παρούσα διατριβή για το μύκητα *Trichoderma* sp..

Συνοψίζοντας λοιπόν, από την παρούσα διατριβή βρέθηκε με βάση τα αποτελέσματα που πάρθηκαν, ότι δύο άχρηστα προϊόντα, ευτελούς αξίας όπως είναι τα υγρά απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας και η καλαμιά σιταριού που απομένει στο χωράφι μετά το τέλος της καλλιέργειας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αμφότερα ως υπόστρωμα για την παραγωγή και ανάπτυξη ωφέλιμων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών έναντι επιβλαβών εδαφογενών παθογόνων, και την διάθεσή τους στη συνέχεια, στην αγορά ως προϊόντα φυτοπροστασίας με προσθήκη βιολογικών παραγόντων .

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Διεθνής Βιβλιογραφία

- Aluko, M. O., and Hering, T. F. (1970). The mechanism associated with the antagonistic relationship between *Corticium solani* and *Gliocladium virens*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 173-179.
- Ayar A., Sert D., Akn N. (2009). The trace metal levels in milk and dairy products consumed in middle Anatolia Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* 152 (1-4), 1-12.
- Baard, S. W. , S. W. P. W.J. van Wyk and G. D. C. Pauer (1981). Structure and lysis of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. *Trans. Br. mycol. Soc.* 77 (2), 251-260
- Bell, A. A. and J. T. Presley. (1969). Temperature effects upon resistance and phytoalexin synthesis in cotton inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 59, 1141-1146.
- Bell, A. A. (1973). Nature of disease resistance. *Proc. of a Work Conference in U.S.A* 30 August-1 September 1971 (Texas) pp: 47-62.
- Berg, G and Ballin, G. (1994). Bacterial antagonists of *Verticillium dahliae* KLEB.. J. Phytopathol. in print.
- Bliss, D. E. (1951). The destruction of *Armillaria mellea* in citrus soils. *Phytopathology* 41, 665-683.
- Brinkerhoff, L. A. (1973). Effects of environment on the pathogen and the disease. *Proc. of a Work Conference in U.S.A* 30 August-1 September 1971 (Texas) pp: 78-88.
- Chet, I. (1987). *Trichoderma*-Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. I. Chet, ed. John Wiley & Sons, New York pp.137-160
- Cimino G., Caristi C. (1990). Acute Toxicity of Heavy Metals to Aerobic Digestion of Waste Cheese Whey. *Biological Wastes* 33, 201-210.

- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C. K., Broadway, R. M., and Harman, G. E. (1993). Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83,308-313.
- Dutta, B.K. (1981). Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of *Verticillium*- wilt. *Plant and Soil* 63, 209-216
- Eastburn, D. M. and R. J. Chang. (1994). *Verticillium dahliae*: A Causal agent of root discoloration of horseradish in Illinois. *Plant Dis. Repr.* 78, 496-498.
- Fravel, D.R.(1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathology* 26, 75-91
- Garber, R. H. (1973). Fungus penetration and development. Proc. of a Work Conference in U.S.A 30 August-1 September 1971 (Texas) p: 69-77.
- Gratelly, P., Benitez, E., Elvira, C., Polo, A., Nogales, R., (1996). Stabilization of sludges from a diary processing plant using vermicomposting. *Developments in Plant and Soil Sciences* 66, 341-343.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84, 377-393.
- Harman, G. E. (2001). Microbial tools to improve crop performance and profitability and to control plant diseases. Pages 4-1 4-14 in: *Int. Sympos. Biol. Control Plant Dis. New Century-Mode Action Application Technol.*
- Henni, J.E.(1988). Evaluation of the effectiveness of certain antagonistic fungi against *Verticillium dahliae* Kleb. *Cryptogamie, Mycologie* 8, 203-207 .
- Howell, C. R. (1982). Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings. *Phytopathology* 72,496-498.

Howell, C. R (2002). Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium spp.* and its biological control with *Trichoderma spp.* *Phytopathology* 92,177-180.

Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D., and Puckhaber, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90, 248-252.

Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. (1983). Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Can. J. Microbiol.* 29, 321-324.

Howell, C. R., Stipanovic, R. D., and Lumsden, R. D. (1993). Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Sci. Technol.* 3, 435-441.

Huber, J.; Bochow, H. und Junge, H. (1987). Selektion und biotechnische Herstellung von Kulturlösungen mikrobieller Antagonisten zur Unterdrückung phytopathogener Bodenpilze. *J. Basic Microbiol.* 27, 497-503

Jaklitsch, W.M. (2009). European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. *Stud Mycol* 63, 1 91

Garber, R. H. and J. T. Presley. (1971). Relation of air temperature to development of *Verticillium* wilt on cotton in the field. *Phytopathology* 61, 204-207.

Garber, R. H. (1973). Fungus penetration and development. *Proc. of a Work Conference in U.S.A* 30 August-1 September 1971 (Texas) pp: 69-77.

Ghafter, A. (1988). Biological control of sclerotial diseases. *Biocontrol Plant Disease.* 1, 153-175

Gonzalez Siso M.I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57, 1-11.

Harman GE (2000) .Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis* 84, 377-393

Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Can. J. Microbiol.* 29:321-324.

Keen, N. K. & Long, M. (1972). Isolation of a phytotoxic protein-lipopolysaccharide complex from *Verticillium albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology* 2, 307-315.

Keinath, A.P.; Fravel, D.R. and Papavizas, C.G. (1981). Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 81, 644-648

Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina I.S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B* 9,753-763

Leben, S.D.; Wadi, J.A. and Easton, G.D. (1987). Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 77, 1592-1595.

Lo, C.-T., Nelson, E. B., Hayes, C. K., and Harman, G. E. (1998). Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology* 88,129-136.

Marios, J.J.; Johnson, S.A.; Dunn, M.T. and Papavizas, G.C. (1982). Biological control of *Verticillium* wilt of eggplant in the field. *Plant Disease* 66, 1166-1168.

Metcalf, D. D., and Wilson, C. R. (2001). The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathol.* 50, 249-257.

Mishra S., Barik S.K., Ayyappan S., Mohapatra B.C. (2000). Fish bioassay for evaluation of raw and bioremediated dairy effluent. *Bioresource Technology* 72, 213-218.

Nachmias, A., Buchner, V. & Krikun, J. (1982). Comparison of protein-lipopolysaccharide complexes produced by pathogenic and non-pathogenic strains of *Verticillium dahliae* Kleb. from potato. *Physiological Plant Pathology* 20, 2, 13-221.

Pesti, M., Tanacs, M. and I. Csolle. (1985). Screening and breeding for *Verticillium* wilt in Capsicum. *Capsicum Newsletter* 4, 64.

Rehner, S. A., and Samuels, G. J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 98,625-634.

Schnathorst, W. C. (1973). Nomenclature and physiology of *Verticillium* species. Proc. of a WorkSchnathorst, W. C. 1973. Nomenclature and physiology of *Verticillium* species. *Proc. of a Work Conference in U.S.A* 30 August-1 September 1971 (Texas) pp: 1-19.

Schreiber, L.R.; Gregory, G.F. (1988). Krause, C.R. and Ichida, J.M.: Production, partial purification and antimicrobial activity of novel antibiotic produced by *Bacillus subtilis* isolated from *Ulmus americana*. *Can.J. Bot.* 66, 2338-2346

Smith, H. C. (1965). The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, and *V. tricorpus*. *N. . Z. J. Agric. Res*, 8, 450-478.

Thanassouloupoulos, C. C. and G. T. Kitsos. (1972). *Verticillium* wilt in Greece. *Plant. Dis. Reprtr.* 56, 264-267.

Thomashow, L.S.; Weller, D.M.; Bonsall, R.F. and Spierson, L.S. (1990). Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environm. Microbiol.* 56, 908-912 .

Tolmsoff, W. J. (1973). Life cycles of *Verticillium* species. *Proc. of a Work Conference, Texas* August 30 to September 1, 1971 pp. 20-38.

Wadi, J.A. and Easton, G.D. (1985). Control of *Verticillium dahliae* by coating potato seed pieces with antagonistic bacteria. In: Parker, C.A., Rovira, A.D. Moore, K.J. and P.T.W. Wong (ed.). *Ecology and management of soilborne plant pathogens*. American Phytopathological Society, St. Paul, 134-136

Webster, J. and Lomas, N. (1964). Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin? *Trans. Br. Mycol. Soc.* 47, 535-540.

Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22, 837-845.

Weindling, R. (1934). Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* 24, 1153-1179.

Weindling, R. (1941). Experimental consideration of the mold toxin of *Gliocladium* and *Trichoderma*. *Phytopathology* 31, 991-1003.

Wells, H. D., Bell, D. K., and Jaworski, C. A. (1972). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62, 442-447.

Woo, S. L., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G. E., Kubicek, C. P., Del Sorbo, G., and Lorito, M. (1999). Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 419-429.

Yedidia, I., Benhamou, N., and Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1061-1070.

Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and Chet, I. (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 863-873.

Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., and Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235, 235-242.

Zhang, J., Howell, C. R., and Starr, J. L. (1996). Suppression of *Fusarium* colonization of cotton roots and *Fusarium* wilt by seed treatments with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. *Biocontrol Sci. Technol.* 6, 175-187.

5.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Γεωργιοπούλου, Μ. (2007). *Ανάπτυξη μεθόδων για την επιλογή της καλύτερης διαθέσιμης τεχνολογίας για την επεξεργασία υγρών βιομηχανικών αποβλήτων*. Πανεπιστήμιο Πατρών. Πάτρα.

Καραδήμα, Κ. (2009). *Εκτίμηση της τοξικότητας διαφόρων σταδίων επεξεργασίας αποβλήτων τυροκομικών μονάδων με χρήση βιοδεικτών*. Πανεπιστήμιο Πατρών. Πάτρα.

Νταρακάς, Ε. (2006). *Επεξεργασία βιομηχανικών αποβλήτων*. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

Παναγόπουλος, Χ.Γ. (1987) . *Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου* . Α.Γ.Σ.Α., Αθήνα.

5.3 Ηλεκτρονικές πηγές

<[http:// www.sustainablefumigation.eu](http://www.sustainablefumigation.eu)>